

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
der Universität Würzburg
Direktor: Prof. Dr. med. H. Einsele
Leiter der Abteilung: Prof. Dr. rer. nat. H. Wajant**



Charakterisierung bi- und trispezifischer anti-CD40 Antikörper- Fusionsproteine

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Christoph Johannes Pauschinger

aus Düsseldorf

Würzburg Dezember 2020

Referentenblatt

Referent bzw. Referentin:

Prof. Dr. Harald Wajant

Korreferent bzw. Korreferentin:

Prof. Dr. Christoph Otto

Dekan:

Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 24.02.2022

Der Promovend ist Arzt

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation: „**Charakterisierung bi- und trispezifischer anti-CD40 Antikörper-Fusionsproteine**“, eigenständig, d. h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Hamburg, den 24.02.2022

Ort, Datum

Unterschrift

Widmung

Meinen lieben Eltern, die mich in jeglicher Lebenslage unterstützen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Bedeutung von CD40 und CD40L bei immunologischen Prozessen.....	1
1.2	CD40 als Zielstruktur in der antikörpervermittelten Antitumorthherapie	2
1.3	Antikörper-Aufbau	3
1.3.1	Single Chain Fragment Variable (scFv).....	7
1.3.2	Struktur und Funktionalität von Fc γ -Rezeptoren.....	8
1.4	Liganden der Tumornekrosefaktor-Superfamilie (TNFSF) und Rezeptoren der Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie (TNFRSF)	10
1.4.1	Tumornekrosefaktor-Superfamilie (TNFSF)-Liganden	11
1.4.2	Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie (TNFRSF)-Rezeptoren	11
1.4.3	Prinzipien der durch TNFSF-Liganden vermittelten TNFRSF-Rezeptoraktivierung	12
1.4.4	Antikörper vermittelte TNFRSF-Rezeptor-Aktivierung.....	16
1.4.5	Konsequenzen aus der Fc γ -Abhängigkeit agonistischer anti-TNFRSF-Rezeptor Antikörper für die TNFRSF-Rezeptor-Aktivierung	17
1.5	CD40-bedingte Signalkaskaden unter spezieller Berücksichtigung von NF κ B.....	17
1.5.1	Allgemeine Aspekte der NF κ B Transkriptionsfaktoren	18
1.5.1.1	Der klassische NF κ B-Signalweg.....	19
1.5.1.2	Der alternative NF κ B-Signalweg.....	20
1.5.2	CD40 bedingte NF κ B-Signalweg Aktivierung	20
1.6	Zielsetzung der Arbeit	22
2	Material	23
2.1	Chemikalien, Reagenzien und Zellkulturmedien.....	23
2.2	Enzyme	25
2.3	Antikörper.....	25
2.4	Kommerzielle Kits	25
2.5	Geräte, Verbrauchs- und Labormaterialien.....	26
2.6	Puffer und Lösungen.....	29
2.7	Zellen und Zelllinien	31
2.8	Plasmide	32

3	Methoden.....	33
3.1	Klonierung.....	33
3.1.1	Polymerase-Kettenreaktion	33
3.1.2	Bandenaufreinigung der PCR-Produkten	33
3.1.3	Restriktionsverdau und Dephosphorylierung.....	34
3.1.4	Vektoraufreinigung.....	35
3.1.5	Ligation	35
3.1.6	Hitzeschock-Transformation klonierter Vektoren in kompetente Zellen	35
3.1.7	Plasmid-Minipräparation	35
3.1.8	Kontrollverdau.....	36
3.1.9	Midipräparation	36
3.1.10	Sequenzierung der Proben	38
3.2	Zellkultur.....	38
3.2.1	Kultivierung adhärenter Zelllinien	38
3.2.2	Produktion der Fusionsproteine.....	39
3.3	Proteinbiochemie	39
3.3.1	Westernblot.....	39
3.3.1.1	SDS-Page	39
3.3.1.2	Blotten	40
3.3.1.3	Immundetektion.....	41
3.3.2	Gleichgewichtsbindungsstudien	41
3.3.3	Interleukin-8 Enzyme linked Immunsorbent Assays (IL-8 ELISA)	43
3.3.4	Durchflusszytometrie	44
3.3.5	Anti-FLAG-Affinitätschromatographie.....	45
3.3.6	Silbergelfärbung.....	46
4	Ergebnisse.....	47
4.1	Klonierung der Expressionsplasmide.....	47
4.2	Produktion der Antikörper-Fusionsproteine.....	49
4.3	Funktionelle Prüfung der produzierten Antikörper-Fusionsproteine.....	53
4.3.1	Affinitätsbestimmung der jeweiligen GpL-Varianten der Antikörper-Fusionsproteine	53
4.3.2	Prüfung der CD40-stimulierenden Aktivität der Antikörper-Fusionsproteine mittels IL-8 ELISA	57
4.4	Produktion und Reinigung einzelner Antikörper-Fusionsproteine.....	72
5	Diskussion	78

6	Zusammenfassung	86
7	Literaturverzeichnis.....	87
	Appendix	94
I.	Abkürzungsverzeichnis	
II.	Abbildungsverzeichnis	
III.	Tabellenverzeichnis	
IV.	DNA- und Aminosäuresequenzen der klonierten Konstrukte	
V.	Danksagung	
VI.	Lebenslauf	

1 Einleitung

Das Immunsystem ist ein komplexes System, bestehend aus Zellen und Molekülen, denen eine Abwehrfunktion gegenüber Infektionen im Organismus zukommt. Es lässt sich in zwei unterschiedliche Systeme einordnen: Das angeborene und das erworbene Immunsystem. Das angeborene Immunsystem besteht aus phagozytierenden Zellen (Neutrophile, Monocyten und Makrophagen), Zellen, die Entzündungsmediatoren freisetzen (Basophile, Mastzellen und Eosinophile) und Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), sowie aus verschiedenen Molekülen (Komplementfaktoren, Akute-Phase-Proteine und Zytokine). Dabei führt eine Antigenexposition zu einer unspezifischen Abwehrreaktion, die nicht durch wiederholte Exposition entsprechend angepasst werden kann. Im Kontrast dazu steht das adaptive Immunsystem, welches aus antigenspezifischen B- und T-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen (APCs), sowie durch B-Zellen produzierten Antikörpern besteht. Dabei kommt es bei Antigenexposition zu einer Immunantwort mit konsekutiver antigenspezifischer B- und T-Zell Aktivierung. Diese führt zum einen zur Bildung antigenspezifischer Antikörper, deren Wirkung spezifisch gegen das jeweilige Antigen gerichtet ist, zum anderen kann die Immunantwort bei erneuter Exposition angepasst und verstärkt werden (Delves and Roitt, 2000).

1.1 Bedeutung von CD40 und CD40L bei immunologischen Prozessen

Ein entscheidendes Molekül, welches adaptives und angeborenes Immunsystem miteinander verknüpft ist CD40, ein Mitglied der Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie (TNFRSF; Beatty et al., 2017).

CD40 wird auf verschiedenen Immunzellen exprimiert, unter anderem auf APCs, wie dendritischen Zellen (DCs), B-Zellen, Monozyten und Makrophagen, aber auch auf Thrombozyten, Fibroblasten, Endothelzellen und glatten Muskelzellen. Der Ligand für CD40 ist CD40L, ein Mitglied der Tumornekrosefaktor-Superfamilie (TNFSF), und wird von aktivierten T-Zellen, aktivierten B-Zellen, T-Gedächtniszellen, NK-Zellen, sowie auch auf Granulozyten und Makrophagen, auf Endothelzellen, glatten Muskelzellen und

auf Thrombozyten exprimiert (Beatty et al., 2017; Elgueta et al., 2009).

Die CD40L-CD40 Interaktion hat verschiedene Auswirkungen, je nach dem Zelltyp, auf denen Ligand und Rezeptor exprimiert werden. So ist die Aktivierung von CD40 DCs für die Förderung der Zytokinproduktion, sowie für die Induktion der Expression von weiteren costimulatorische Molekülen auf der Oberfläche und für die Kreuzpräsentation von Antigenen unerlässlich. Alles in allem führen CD40 aktivierte Signalkaskaden zur Reifung von DCs, um eine adäquate T-Helferzell- und zytotoxische T-Zell Aktivierung und Differenzierung regulieren zu können (Quezada et al., 2004).

Eine CD40 bedingte Aktivierung von B-Zellen fördert die Bildung von Keimzentren der B-Zellen (germinal centers; GCs) in sekundären lymphatischen Organen, Immunglobulin-Isotypen-Wechsel, somatische Hypermutation der Immunglobuline, sowie Bildung von Plasmazellen und Gedächtniszellen (Danese et al., 2004).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass CD40 aktivierte Signalkaskaden essenziell für das Überleben verschiedener Zelltypen (DCs, aktivierte B-Zellen) sind, und zwar sowohl unter physiologischen als auch unter inflammatorischen Bedingungen (Bishop et al., 2007).

1.2 CD40 als Zielstruktur in der antikörpervermittelten Antitumorthherapie

Wie bereits schon unter 1.1. erwähnt, ist die CD40-Aktivierung auf Immunzellen von entscheidender Bedeutung für immunologische Prozesse. So konnte bereits gezeigt werden, dass die Aktivierung von CD40 auf DCs durch CD40L, exprimiert von aktivierten T-Helferzellen, zur Antigenpräsentation und somit zur Aktivierung antigenspezifischer zytotoxischer T-Zellen führt (Vonderheide, 2018).

Dieser Mechanismus wird in der Tumorthherapie therapeutisch genutzt. Prinzipiell ist eine Stimulation von CD40 über rekombinantes CD40L, CD40L-Gen-Therapie und agonistischer CD40-Antikörper möglich. Dabei hat sich gezeigt, dass die antikörpervermittelte Aktivierung von CD40 den besten Effekt hat (Beatty et al., 2017).

Daher wurde das Konzept der Antikörper vermittelten CD40-Aktivierung auch bereits in klinischen Studien untersucht, um eine effektive T-Zell-Stimulierung und damit einhergehend eine Immunantwort gegen tumorassoziierte Antigene hervorzurufen (Beatty et al., 2017). Ferner kann über eine Stimulation von CD40 auf Makrophagen eine zytotoxische antitumoröse Wirkung vermittelt werden (Buhtoiarov et al., 2006).

Eine Vielzahl von Tumorzellen exprimieren auch CD40, beispielsweise B-Zell-Lymphome, aber auch solide Tumore. So konnte *in vitro* über eine Aktivierung von CD40 auf B-Zelllinien in Abwesenheit von Immunzellen ein direkter zytotoxischer Effekt hervorgerufen werden, sodass das Wachstum der Zellen inhibiert wurde (Funakoshi et al., 1994; Hess and Engelmann, 1996).

Aus den genannten Gründen stellt CD40 ein attraktives Ziel in der antikörpervermittelten Tumorthherapie dar.

1.3 Antikörper-Aufbau

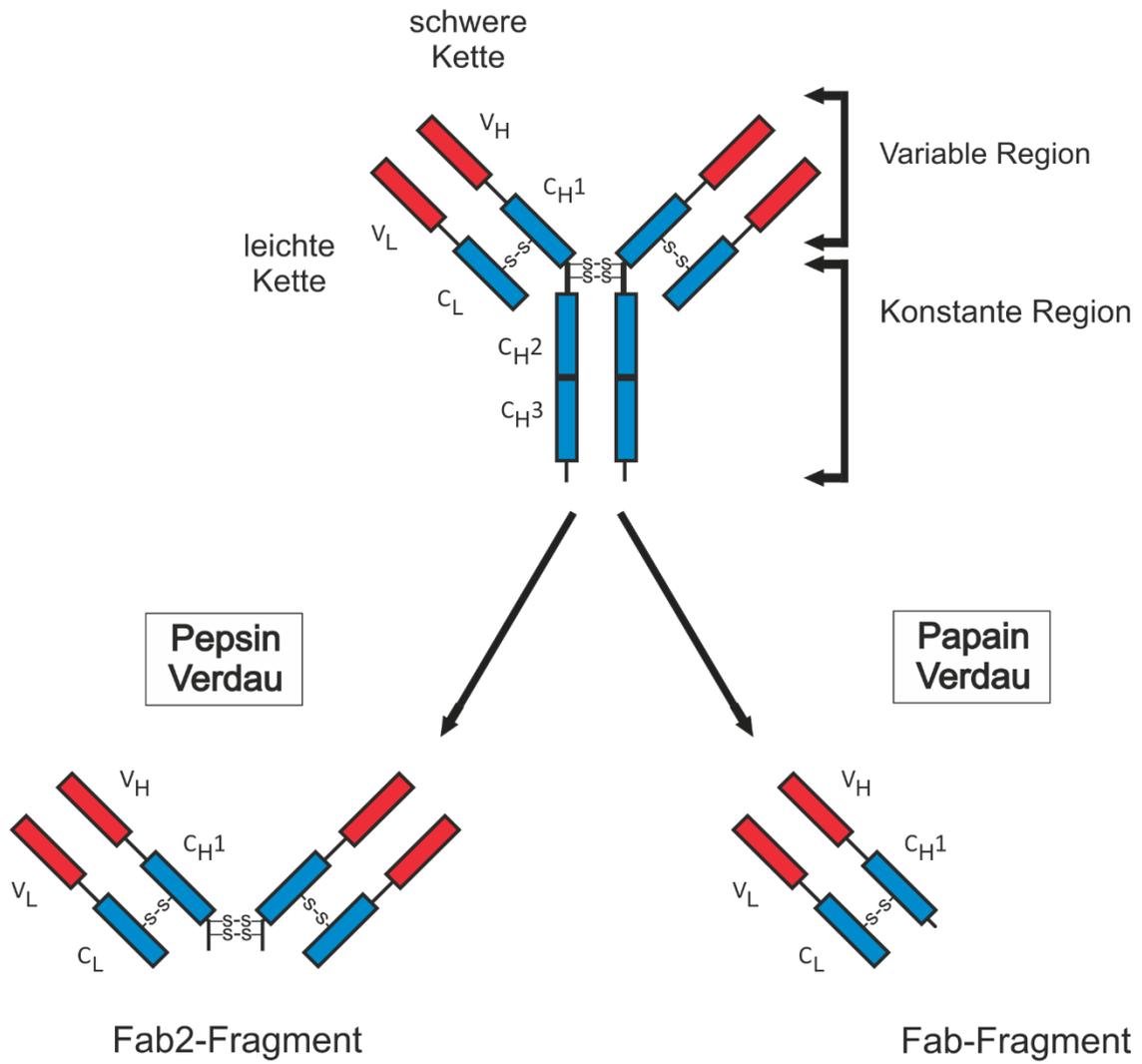
Antikörper sind Glykoproteine, die zum einen Teil des angeborenen Immunsystems sind und zum anderen durch Reifungsprozesse Teil der adaptiven Immunantwort sein können. Sie können in fünf unterschiedliche Isotypen, IgG, IgM, IgE, IgA und IgD, eingeteilt werden, sowie in weitere Subklassen: IgG in die Subklassen IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4, IgA in die Subklassen IgA1 und IgA2. Immunglobuline können entweder als B-Zell-Rezeptor auf der Zelloberfläche von B-Lymphozyten vorkommen oder löslich im Blut als sogenannte Antikörper zirkulieren. Immunglobuline sind in der Lage, hochspezifische Strukturen, sogenannte Antigene, von Viren, Bakterien, Pilzen und anderen pathogenen Strukturen, aber auch körpereigene Antigene zu erkennen und verschiedene immunologische Prozesse nach der Bindung an diese zu initiieren (Brezski and Georgiou, 2016).

Immunglobuline gehören zur Immunglobulin-Superfamilie (IgSF) und bilden mittels vier Polypeptidketten eine Y-förmige Struktur. Diese wird aus zwei schweren Ketten (HC; *heavy chain*) mit einem Molekulargewicht von je ca. 50 kDa und zwei leichten Ketten (LC; *light chain*) mit einem Molekulargewicht von je ca. 25 kDa gebildet. Jede Kette besitzt wiederum eine N-terminale variable

(V) Domäne und eine oder mehrere C-terminal gelegene konstante (C) Domäne. So setzt sich die LC aus einer V-Domäne (V_L) und einer C-Domäne (C_L) zusammen, wohingegen jede HC aus einer V-Domäne (V_H) und drei bis vier C-Domänen (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} , C_{H4}) aufgebaut ist (Schroeder and Cavacini, 2010; Stanfield and Wilson, 2014).

Die Verbindung der HCs und LCs untereinander differiert für die verschiedenen Isotypen und Subtypen (Hmiel et al., 2015). So sind bei IgG1-Antikörpern die HCs durch Disulfidbrücken in der Hinge-Region, einer Gelenkregion im Bereich der C_{H2} Region, miteinander verbunden. LC und HC sind im Bereich der C_L und C_{H1} Region miteinander verknüpft (s. Abb. 1) (Liu and May, 2012).

A



B

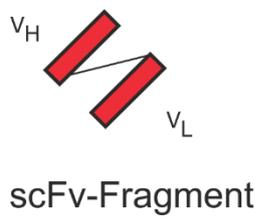


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines IgG1 Antikörper und eines single chain fragment variable (scFv)

(Angelehnt an Antibody fragments (Nelson and Reichert, 2009)

A: Darstellung eines IgG1 Antikörpers

Die Abbildung zeigt den schematischen Aufbau eines IgG1-Antikörpers bestehend aus zwei leichten Ketten (LC) und zwei schweren Ketten (HC), sowie die jeweilige Anordnung der variablen Domäne (V) und konstanten Domäne (C) der jeweiligen Ketten. Durch den enzymatischen Pepsin Verdau des Antikörpers entsteht ein Fab₂-Fragment, und zwei Fc-Fragmente, welche aus C_{H2} und C_{H3} bestehen. Durch den Verdau mit dem Enzym Papain entstehen zwei einzelne Fab-Fragmente (*fragment antigen binding*) und ein Fc-Fragment (*crystallisable*).

B: Darstellung eines single chain fragment variable (scFv)

Die Abbildung zeigt den schematischen Aufbau eines *single chain fragment variable* (scFv) bestehend aus der variablen Domäne der schweren Kette V_H und der leichten Kette V_L, die mittels Peptidlinker miteinander verknüpft sind.

C_{H1}, C_{H2}, C_{H3}: konstante Domänen 1-3 der schweren Kette, C_L: konstante Domäne der leichten Kette, V_H: variable Domäne der schweren Kette, V_L: variable Domäne der leichten Kette, S-S: Disulfidbrücken

Studien bezüglich der Immunglobulinstruktur der Klasse IgG führten zum Verständnis des funktionellen Aufbaus der Immunglobuline.

Das Enzym Papain spaltet IgG-Antikörper in zwei Fab-Fragmente (*fragment antigen binding*) und in ein dimeres Fc-Fragment (*fragment crystallizable*). Pepsin spaltet IgG in ein einzelnes dimeres F(ab)₂, und in zwei einzelne Fc-Fragmente. Eine weitere Unterteilung des Fab-Fragments erfolgt in ein Fv (*variables Fragment*) aus V_H und V_L und Fc-Fragment (*konstantes Fragment*) aus C_L und C_{H1} (s. Abb.1). Nach Spaltung bleibt die antigenbindende Eigenschaft sowohl für Fab- als auch F(ab)₂-Fragmente erhalten, jedoch entfällt die durch die Fc-Domäne vermittelte Aktivierung von Fc-Rezeptoren, sowie die Aktivierung des Komplementsystems (Schroeder and Cavacini, 2010; Stanfield and Wilson, 2014).

Die Antigenpezifität der Antikörper wird über die V-Domänen der HC und LC der Fab-Region bedingt. Jede einzelne V-Domäne der HC und LC besitzt drei hypervariable Regionen, sogenannte CDRs (*complementary determining regions*), die gemeinsam die Antigenbindungsstelle bilden. Durch Gen Rearrangement, alternative Spleißprozesse sowie durch somatische Hypermutation der für die V-Domänen kodierenden Gene, entsteht eine extreme Vielfalt der antigenbindenden Region, sodass unterschiedlichste Strukturen/Antigene gebunden werden können (Hmiel et al., 2015).

Die Fc-Region bedingt über die Bindung an verschiedene Fc-Rezeptoren, die auf verschiedenen Immunzellen exprimiert werden, sowie durch Aktivierung anderer Immunmediatoren wie das Komplementsystem, die Effektorfunktion nach Antigenbindung (Nimmerjahn and Ravetch, 2008).

1.3.1 Single Chain Fragment Variable (scFv)

Antikörper können durch proteolytischen Verdau in einzelne Fragmente (Fab- / Fc-Fragment) gespalten werden (s. 1.2). Weiterhin können mittels *genetic engineering* einzelne Bereiche der HC und LC auf verschiedenste Weise kombiniert werden, um rekombinante antigenbindende Fragmente zu generieren, beispielsweise Fab-Fragmente oder *single chain fragment variable* (scFv)-Proteine (Nelson and Reichert, 2009).

ScFv ist eine aus dem Fv-Fragment gentechnisch eigenständig modifizierte Antikörpervariante. Das Fv-Fragment ist die kleinste funktionelle antigenbindende Einheit der Immunglobuline. Das scFv setzt sich aus der variablen Region der schweren (V_H) und der leichten Kette (V_L) zusammen, die mittels eines Linker-Peptids miteinander verknüpft sind und ein Molekulargewicht von 25 kDa aufweist (s. Abb. 1) (Ahamadi-Fesharaki et al., 2019; Ahmad et al., 2012). Diese Moleküle können genutzt werden, um bispezifische Antikörper-Moleküle gentechnisch zu generieren. Das funktionelle Prinzip der bispezifischen Antikörper-Moleküle ist die Fähigkeit, verschiedene Epitope zu binden. Diese bispezifischen Antikörper gewinnen in der antikörpervermittelten medikamentösen Therapie verschiedenster Erkrankungen zunehmend an Bedeutung. Zum einen können verschiedene Signalkaskaden durch Bindung von bestimmten Rezeptoren aktiviert werden, die gemeinsam einen synergistischen Effekt haben. Zum anderen besteht auch die Möglichkeit der Rekrutierung von Immunzellen und somit der Umleitung einer zellulären Immunantwort auf bestimmte Zielzellen, beispielsweise Tumorzellen (Kontermann, 2012).

So konnte bereits in laborexperimentellen Untersuchung durch Dong et al und Michaelson et al. die Möglichkeit der gentechnischen Fusion von scFv-Fragmenten an IgG1-Moleküle C- oder N-terminal gezeigt werden (Dong et al., 2011; Michaelson et al., 2009). Damit ist die biotechnologische Generierung tetravalenter, bispezifischer Antikörper mittels scFv-Fragmenten in vielfältiger Weise möglich.

1.3.2 Struktur und Funktionalität von Fc γ -Rezeptoren

Antikörper binden an Immunzellen (s. Tab. 1), welche Fc-Domäne bindende Rezeptoren exprimieren, sogenannte Fc-Rezeptoren (FcRs). Durch Bindung an die jeweiligen FcRs wird der humorale Anteil des Immunsystems mit dem des zellulären Anteils verknüpft (Bruhns et al., 2009; Ravetch and Bolland, 2001).

So können Antikörper durch Opsonierung von Antigenen FcRs quervernetzen und somit zur Aktivierung von NK-Zellen führen, die zytotoxische Granula freisetzen und damit zur Apoptoseinduktion in denjenigen Zellen führen, die die jeweiligen Antigene exprimieren. Dieser Mechanismus wird als *antibody-dependent cellular cytotoxicity* (ADCC) bezeichnet. Ebenso ist die Aktivierung von FcRs durch Antigen-gebundene Antikörper auf Makrophagen und Monozyten möglich, was zur Aktivierung der Phagozytosefähigkeit derselben führt. Dies wird als *antibody-dependent cell mediated phagocytosis* (ADCP) bezeichnet. Weitere zelluläre Prozesse, initiiert durch antikörpervermittelte FcR-Aktivierung, sind Zytokinfreisetzung, Freisetzung von Sauerstoffradikalen und Antigenpräsentation, sowie die Aktivierung des Komplementsystems (Brandsma et al., 2015; Nimmerjahn and Ravetch, 2007; Wang et al., 2019).

FcRs sind transmembrane Glykoproteine. Die FcR-Familie beinhaltet fünf Rezeptoren für ihren jeweiligen Antikörper: Fc α Rs (IgA), Fc γ Rs (IgG), Fc δ Rs (IgD), Fc ϵ Rs (IgE), Fc μ Rs (IgM) (Radaev and Sun, 2002).

Unterschiedliche Gene codieren für 6 humane Fc-gamma Rezeptoren (hFc γ Rs): Fc γ RI, Fc γ RII mit den Isoformen Fc γ RIIA, Fc γ RIIB und Fc γ RIIC und Fc γ RIII-Isoformen Fc γ RIIIA und Fc γ RIIIB. Davon sind alle hFc γ Rs aktivierend, außer der inhibitorische Fc γ RIIB, wobei die Signalinduktion mittels *immune tyrosine activating motif* (ITAM) oder *immune tyrosine inhibition motif* (ITIM) reguliert wird (Li and Kimberly, 2014). Eine weitere Unterteilung der hFc γ Rs erfolgt nach ihrer Affinität für IgGs. Einzig Fc γ RI weist eine hohe Affinität auf, alle anderen hFc γ Rs weisen eine niedrige Affinität für IgGs auf, was dazu führt, dass Fc γ RI als einziger Rezeptor in der Lage ist, monomeres IgG zu binden. Alle anderen Fc γ Rs, interagieren selektiv mit Antikörpern in Form von Immunkomplexen (IC), bestehend aus multiplen Antikörpern, die ihr Antigen

gebunden haben (Nimmerjahn and Ravetch, 2007). Jedoch ist die generell niedrige Affinität der hFc γ Rs funktionell von großer Bedeutung, denn sie verhindert die Bindung monomerer Antikörpermoleküle, die im Serum physiologisch in hohen Konzentrationen vorkommen, sodass unspezifische proinflammatorische Aktivierungen verhindert werden. Im Gegensatz dazu ist der hochaffine Rezeptor Fc γ RI konstant mit IgG gesättigt, dabei kommt es aber ebenfalls nur zur einer Zellaktivierung nach Quervernetzung des Fc γ RI durch Antigene wie bei den restlichen hFc γ Rs (Nimmerjahn and Ravetch, 2008). Inhibierende und agonistische hFc γ Rs werden auf den meisten Immuneffektorzellen koexprimiert. Einzige Ausnahme stellen dabei B-Zellen dar, die den inhibitorischen Fc γ RIIB exprimieren, der vor allem regulatorisch wirkt, und NK-Zellen, die einzig den aktivierenden Fc γ RIIIA exprimieren. Dieses Ko-Expressionsmuster reguliert durch die Festlegung eines Schwellenwertes für die Aktivierung von Immunzellen die Immunantwort (Masuda et al., 2009; Nimmerjahn and Ravetch, 2008).

Es bedarf einer strengen Regulierung der Fc-Fc γ R-Interaktion, um beispielsweise unerwünschte Nebenwirkungen durch therapeutische Antikörper zu vermeiden. Dies kann beispielsweise durch die Nutzung von Antikörperfragmenten, wie Fab₂ oder scFv (s. Abb.1) erreicht werden. In anderen Fällen benötigen therapeutische Antikörper die Fc γ R-Abhängigkeit, um ihre agonistische Aktivität zu entfalten. So werden Antikörper durch die Bindung an Fc γ R membranständig. Dies ist von entscheidender Bedeutung für die Aktivierung der Rezeptoren der Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie (TNFRSF), zu der auch CD40 zugehörig ist (Wajant, 2015).

Tabelle 1: Tabellarische Darstellung der Expression einzelner humaner Fc γ -Rezeptoren (hFc γ R) auf den jeweiligen Immunzellen

Angelehnt an Targeting the Fc-receptor in autoimmune disease (Li and Kimberly, 2014)

Rezeptor		Fc γ RI	Fc γ RIIa	Fc γ RIIb	Fc γ RIIc	Fc γ RIIIa	Fc γ RIIIb
Vorkommen	Monozyten	x	x	x		x	
	Makrophagen	x	x	x		x	
	DC	x	x	x		x	
	Mastzellen			x			x
	Neutrophile	x	x	x			x
	Basophile			x			
	Eosinophile	x					x
	NK-Zellen				x	x	
	B-Zellen						
	T-Zellen						

1.4 Liganden der Tumornekrosefaktor-Superfamilie (TNFSF) und Rezeptoren der Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie (TNFRSF)

CD40 als Rezeptor und CD40L als Ligand gehören zur Gruppe der Tumornekrosefaktor-Superfamilie (TNFSF). Rezeptoren der Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie (TNFRSF) werden durch ihre jeweiligen Liganden aktiviert. Tumornekrosefaktor (TNF) wird von Makrophagen und Lymphozyten bei bakteriellen Infektionen, inflammatorischen Prozessen und durch weitere Stimuli freigesetzt. Basierend auf Aminosäuresequenz-Homologien zu TNF konnten insgesamt 19 Liganden der TNFSF identifiziert werden, die mit 29 TNFRSF interagieren (Aggarwal et al., 2012; Apostolaki et al., 2010).

Die Interaktion zwischen Liganden der TNFSF und Rezeptoren der TNFRSF spielt eine entscheidende Rolle in Zellproliferations- und Zelldifferenzierungsmechanismen. Ferner reguliert dieser Mechanismus die Apoptose oder das Überleben von Zellen. Die TNFSF-Liganden und TNFRSF-Rezeptor Interaktion sind somit von entscheidender Bedeutung bei inflammatorischen Prozessen und bei der Initialisierung einer Immunantwort, sowie in der Organogenese sekundär lymphatischer Organe. Deswegen ist eine strikte Regulierung notwendig, da Dysregulationen der TNFSF-Liganden- und TNFRSF-Rezeptoren-Interaktion eine Rolle in der Entwicklung von

Autoimmunerkrankungen und inflammatorischer Prozesse, aber auch in der Entstehung von malignen Erkrankungen eine Rolle spielen (Hehlhans and Pfeffer, 2005; Magis et al., 2012).

1.4.1 Tumornekrosefaktor-Superfamilie (TNFSF)-Liganden

Die Zuordnung der Liganden zu TNFSF erfolgt über eine Domäne am carboxyterminalen, extrazellulären Ende der Proteinstruktur, die als TNF-homologe Domäne (THD) bezeichnet wird.

Die THD-Domäne fördert die Assemblierung der TNFSF-Liganden zu nicht kovalent gebundenen homotrimeren Molekülen. TNFSF-Liganden können als transmembrane Proteinstrukturen oder auch in sekretierter Form vorkommen. Der Großteil wird als trimeres Typ II transmembranöses Protein exprimiert (intrazellulärer N-Terminus und extrazellulärer C-Terminus), wobei die transmembrane Domäne über eine *Stalk-Region* von der THD-Domäne separiert ist. Durch proteolytische Prozesse an der *Stalk-Region*, katalysiert durch Enzyme wie Matrix Metalloproteinasen (MMP), entstehen lösliche Liganden, die weiterhin die THD Domäne enthalten und dadurch zur Interaktion mit TNFRSF-Rezeptoren befähigt sind (Bodmer et al., 2002; Locksley et al., 2001; Wajant, 2015).

1.4.2 Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie (TNFRSF)-Rezeptoren

Die Zugehörigkeit der Rezeptoren zur TNFRSF-Gruppe erfolgt über Cystein reiche Domäne (*cystein rich domains* CRDs), die sich im extrazellulären Strukturanteil des Rezeptors befinden und mit der THD Domäne der Liganden interagieren. Die TNFRSF-Rezeptoren sind zum großen Teil als Typ I transmembranöse Proteine (extrazellulärer N-Terminus und intrazellulärer C-Terminus) vorhanden. Einige wenige werden als Typ III transmembranöse Proteine (extrazellulärer N-terminus mit keiner Signalfunktion) klassifiziert, sind mittels Glycosylphosphatidylanker in der Membran verankert oder kommen in löslicher Form vor. Weiterhin ist die Generierung löslicher Rezeptoren über proteolytische Prozesse oder alternative Spleißprozesse möglich (Bodmer et al., 2002; Magis et al., 2012).

Aufgrund des variierenden funktionalen Aspektes lassen sich die Rezeptoren der TNFRSF in drei verschiedene Gruppen unterteilen. Die erste Gruppe der TNFRSF-Rezeptoren weisen an ihrem intrazellulären Anteil eine Todes-Domäne (*death domain* DD) auf, wodurch über Bindung weiterer Signalmoleküle wie *Fas-associated death domain* (FADD) *TNFR1-associated death domain* (TRADD) apoptotische Zellmechanismen in Gang gesetzt werden. Die zweite Gruppe wird als TRAF-interagierende TNFRSF-Rezeptoren bezeichnet, zu denen CD40 gehört. Diese Rezeptoren verfügen über ein bis drei Bindungsstellen, die TNF-Rezeptor assoziierte Faktoren (TRAF) binden und überwiegend proinflammatorische Signalkaskaden aktivieren, beispielsweise über die Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kaskade (MAP3K) oder NF κ B (*Nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells*) Signalwege. Die letzte Gruppe sind vor allem für regulatorische Mechanismen verantwortlich, weswegen diese als *Decoy-Rezeptoren*, sogenannte Lockrezeptoren, bezeichnet werden. Diese binden keine weiteren intrazellulären Signalmoleküle und fungieren somit als TNFSF-Ligand-Inhibitor. Sie können sowohl löslich als auch membrangebunden vorliegen (Vanamee and Faustman, 2018; Wajant, 2015).

1.4.3 Prinzipien der durch TNFSF-Liganden vermittelten TNFRSF-Rezeptoraktivierung

Nicht jede Bindung eines Liganden der TNFSF an den jeweiligen Rezeptor der TNFRSF führt zwangsläufig zu einer Aktivierung des Rezeptors. Lösliche Liganden der TNFSF sind einerseits in der Lage, einen Teil der TNFRSF-Rezeptoren zu aktivieren, andere jedoch nicht. Dabei kommt es durch membranständige Liganden immer zu einer Aktivierung der Rezeptoren der TNFRSF (Grell et al., 1998; Wajant, 2015).

Die Grundlage für das Verständnis der Rezeptoraktivierung bilden Röntgenstrukturanalysen, die nachweisen konnten, dass jeweils ein Ligand des trimeren TNFSF-Ligandenkomplexes, der über die THD-Domäne der Liganden generiert wird (s. 1.3.3), mit einem TNFRSF-Rezeptor interagiert

sodass ein TNFSF₃-TNFRSF₃-Komplex gebildet wird (Aggarwal et al., 2012; Wajant, 2015).

Auch in Abwesenheit von Liganden kommt es bereits zum Aneinanderlagern von TNFRSF-Rezeptoren zu Dimeren oder Trimeren (Chan, 2007).

Diese Selbstassemblierung wird über eine *pre-ligand-binding assembly domain* (PLAD) vermittelt. Die PLAD-Domäne stellt dabei die erste CRD-Domäne des extrazellulären Anteils der TNFRSF-Rezeptoren dar und ist nicht in die Ligandenbindung involviert. Es bestehen also präassemblierte Rezeptor-Oligomere-Komplexe, ohne dass ein Ligand gebunden hat. Die einzelne Bindungsstärke der PLAD-PLAD Interaktion ist eher niedrig und bewegt sich im μM Bereich, variiert jedoch zwischen den einzelnen TNFRSF-Rezeptoren (Cao et al., 2011).

Durch Oligomerisierung der einzelnen TNFRSF-Rezeptoren zu Trimeren wird die Bindungsaffinität gegenüber TNFSF-Liganden gesteigert und somit die Bindungswahrscheinlichkeit erhöht (Chan, 2007). Nach der Bildung des PLAD vermittelten TNFSF₃-TNFRSF₃-Komplexes können weitere Adapterproteine, z.B. TRAF (TNF-receptor associated factor), rekrutiert und verschiedene Signalkaskaden initialisiert werden. Entscheidend für eine starke Rezeptoraktivierung, die vor allem für die Induktion der Apoptose sowie für die Immunstimulation über den NF- κ B-Signalweg wichtig ist, ist das Aneinanderlagern von TNFSF₃-TNFRSF₃-Komplexen zu oligomeren transaktivierten (TNFSF₃-TNFRSF₃)₂ Komplexen (Wajant, 2015). Dies ist abhängig von der PLAD-PLAD-Interaktion der TNFRSF-Rezeptoren, sowie vom Vorliegen der Liganden in löslicher oder membrangebundener Form. Membrangebundene TNFSF-Liganden führen über eine Mobilitätseinschränkung und eine damit einhergehende entsprechende räumliche Ausrichtung zu einer schnelleren Aggregation von TNFSF₃-TNFRSF₃-Komplexen zu oligomeren transaktivierten (TNFSF₃-TNFRSF₃)₂ Komplexen. Lösliche TNFSF-Liganden sind zwar ebenfalls in der Lage nach Bindung der TNFRSF-Rezeptoren spontan (TNFSF₃-TNFRSF₃)₂ Komplexe zu bilden, jedoch ist dies primär abhängig von der Eigenaffinität der Rezeptoren. Eine Begünstigung der Bildung von (TNFSF₃-TNFRSF₃)₂ Komplexen durch

lösliche TNFSF-Liganden kann durch sekundäre Oligomerisierung via Antikörpern, die Oberflächenstrukturen der TNFSF-Liganden binden, oder durch gentechnische Bindung an Proteindomänen, die die Zusammenlagerung von zwei oder mehreren Ligandentrimeren vermitteln, erreicht werden (Wajant, 2015). Des Weiteren ist es möglich, lösliche Liganden an Zelloberflächen mittels Fusionsproteinen zu koppeln, die einerseits den Liganden binden, andererseits Zelloberflächenantigene erkennen. Damit wird der lösliche Ligand „pseudomembranständig“, wodurch das Aktivierungsmodell durch membranständige TNFSF-Liganden (s.o.) imitiert wird (Fick et al., 2012; Lang et al., 2012). Man kann also von einem zweistufigen Modell der TNFRSF-Rezeptoraktivierung ausgehen. Im ersten Schritt bindet ein THD vermitteltes TNFSF-Liganden Homotrimer die jeweiligen PLAD-vermittelten präassemblierten Rezeptoren, wodurch ein aktiver TNFSF₃-TNFRSF₃-Komplex entsteht, der wiederum im zweiten Schritt mit weiteren TNFSF₃-TNFRSF₃-Komplexen zu einer supramolekularen Struktur oligomerisiert, die in der Lage ist, die jeweilige Signalkaskadeninduktion zu initialisieren. Dabei ist die Bildung der supramolekularen Struktur der TNFSF₃-TNFRSF₃-Komplexe nicht für alle TNFRSF-assoziierten Signalkaskaden notwendig, jedoch für die Apoptoseinduktion oder die Aktivierung des NF κ B-Signalweges unerlässlich (Wajant, 2015).

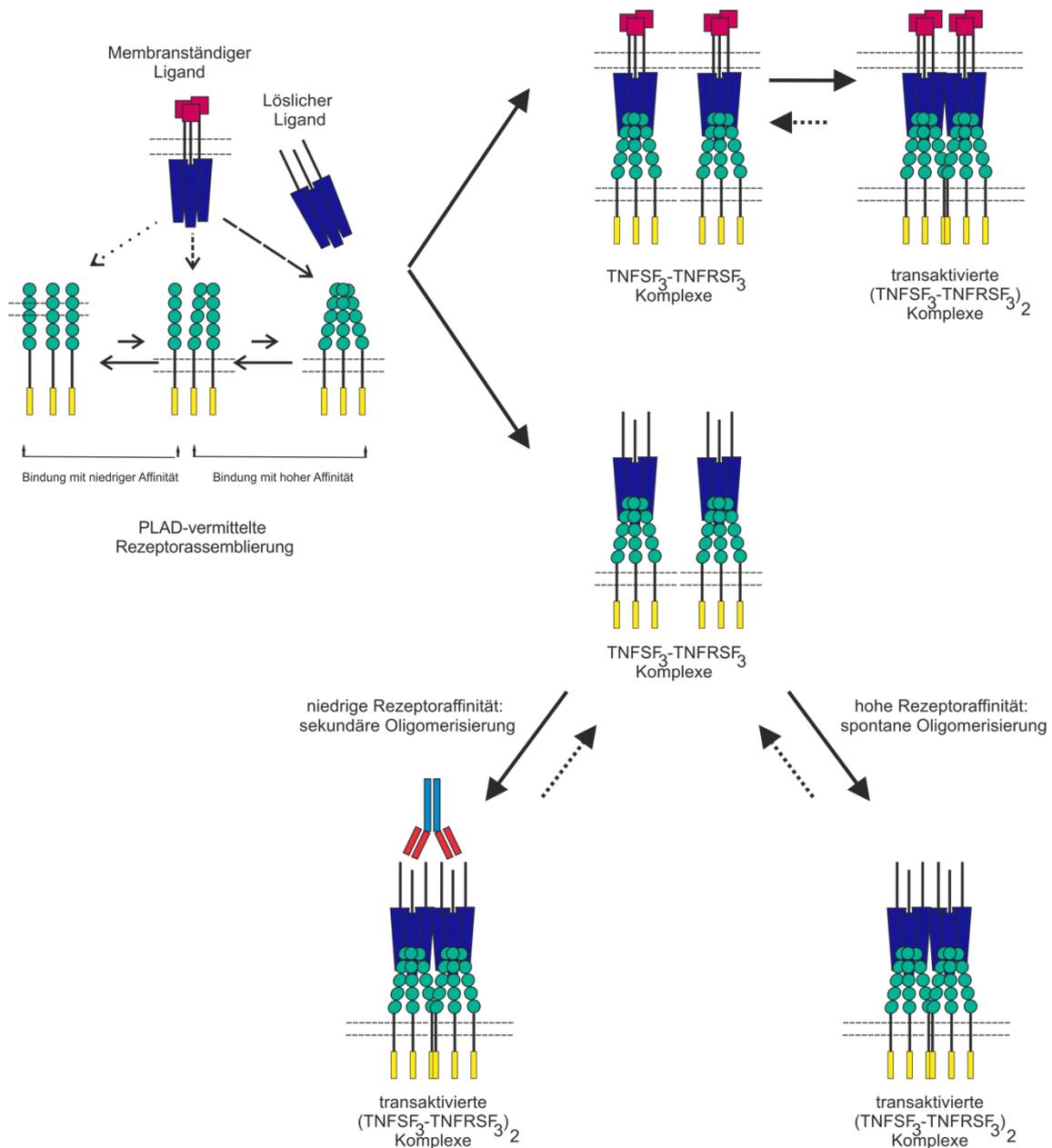


Abbildung 2: Schematische Darstellung der TNFSF-Liganden vermittelten TNFRSF-Rezeptoraktivierung durch membranständige oder lösliche Liganden

(Angelehnt an Principles of antibody-mediated TNF receptor activation (Wajant, 2015))
 Die Ausbildung von aktiven TNFSF₃-TNFRSF₃-Komplexen kann durch membranständige und lösliche Liganden vermittelt werden. Entscheidend ist die PLAD-Domäne (pre-ligand-assembly-domain) der einzelnen TNFRSF-Rezeptoren, die zu Präassemblierung der Rezeptoren führt und damit eine Bildung der TNFSF₃-TNFRSF₃-Komplexe begünstigt, die in der Lage sind, schwache Signalkaskaden zu initialisieren. Durch Oligomerisierung einzelner TNFSF₃-TNFRSF₃-Komplexe entstehen (TNFSF₃-TNFRSF₃)₂ Komplexe, welche eine stärkere Signalkaskadeninitiierung aufweisen. Membrangebundene Liganden sind durch ihre räumliche Ausrichtung in der Lage, diese Komplexe zu bilden, wohingegen die (TNFSF₃-TNFRSF₃)₂ Komplex-Bildung, vermittelt durch lösliche Liganden, abhängig von der Eigenaffinität des jeweiligen Rezeptors ist oder mittels sekundärer Oligomerisierung der Liganden durch Antikörper erreicht werden kann.

1.4.4 Antikörper vermittelte TNFRSF-Rezeptor-Aktivierung

Oft werden TNFRSF-Rezeptor-spezifische Antikörper verwendet, um Zelltod-induzierende TNFRSF-Rezeptoren auf Tumorzellen zu aktivieren (TRAILR1, TRAILR2) oder um costimulatorische Rezeptoren auf Immunzellen zu aktivieren (41BB, GITR, CD27, CD40) (Wajant, 2015).

Generell ist eine Aktivierung auch über rekombinante TNFSF-Liganden möglich, jedoch sind die Antikörper in ihrer Pharmakokinetik den rekombinanten TNFSF-Liganden überlegen, die beispielsweise eine sehr kurze Serumhalbwertszeit aufweisen (10-30 min) und somit aufwändiger klinischer Applikationsmethoden, wie z.B. einer Infusion, bedürfen (Beutler et al., 1985; Flick and Gifford, 1986; Kelley et al., 2001). Entsprechend dem zweistufigen Aktivierungsmodell der TNFRSF-Rezeptoren über die Clusterbildung von TNFSF₃-TNFRSF₃-Komplexen zu (TNFSF₃-TNFRSF₃)_{n≥2} Clustern scheint die Valenz der Antikörper von entscheidender Bedeutung zu sein. So konnte durch Engelmann et al. und Dhein et al. gezeigt werden, dass eine sekundäre Oligomerisierung mittels Protein A bzw. sekundärer Antikörper und die damit einhergehende räumliche Assoziation mehrerer Antikörperbindungsstellen dimerer Antikörper zu einer starken Aktivierung von TNFRSF-Rezeptoren führt (Dhein et al., 1992; Engelmann et al., 1990). Durch die räumliche Aggregation der Bindungsstellen TNFRSF-spezifischer Antikörper mittels sekundärer Oligomerisierung kommt es durch räumliche Assoziation mehrerer Rezeptoren der TNFRSF zur antikörpervermittelten Clusterbildung und somit entsprechend dem Aktivierungsmodell zur suffizienten Aktivierung der Rezeptoren.

Des Weiteren können IgG-Antikörper über die Bindung von Fc γ -Rezeptoren ähnlich wie membrangebundene TNFSF-Liganden Membran-assoziiert präsentiert werden und so aufgrund der sehr hohen Konzentrationen in der Zell-Zell-Kontaktzone eine Clusterbildung von TNFRSF-Rezeptoren vermitteln (Kornbluth et al., 2012).

1.4.5 Konsequenzen aus der Fc γ -Abhängigkeit agonistischer anti-TNFRSF-Rezeptor Antikörper für die TNFRSF-Rezeptor-Aktivierung

Durch die Fc γ -Abhängigkeit des Aktivierungspotenzial TNFRSF-spezifischer Antikörper ergeben sich einige Limitationen. Durch die Bindung des Fc-Anteils der Antikörper an Fc γ -Rezeptoren werden entsprechende Effektorfunktionen des Immunsystems aktiviert (s. 1.2.2). Dies birgt einerseits die Gefahr der systemischen Aktivierung des Immunsystems, was zu schwerwiegenden Nebenwirkungen führen kann. So kann es in Folge der Verabreichung von monoklonalen Antikörpern zu einer überschießenden Zytokinfreisetzung kommen, bis hin zum Zytokin-release-Syndrom. Die Symptome variieren dabei von Fieber und Übelkeit über Bronchospasmus, Dyspnoe, Hypertension bis zum Lungenödem. Pathophysiologisches Korrelat ist die systemische Freisetzung von Zytokinen, unter anderem Tumornekrosefaktor alpha (TNF α), Interferon γ und Interleukin 6, wobei anzunehmen ist, dass die Freisetzung und Aktivierung von Immunzellen durch den Fc-Anteil des Antikörpers vermittelt wird (Kroschinsky et al., 2017), aber in manchen Fällen auch durch die aktivierten TNFRSF-Rezeptoren. Andererseits stellt die Bioverfügbarkeit der Fc γ -Rezeptoren ein weiteres Problem dar. So kann es letztendlich nur dann zu einer Aktivierung der TNFRSF-Rezeptoren mittels Antikörpern kommen, wenn in der unmittelbaren räumlichen Umgebung Fc γ R-exprimierende (Immun)zellen vorhanden sind, sodass überhaupt eine Fc γ -Bindung möglich ist (Kornbluth et al., 2012).

1.5 CD40-bedingte Signalkaskaden unter spezieller Berücksichtigung von NF κ B

Durch die Aktivierung von CD40 werden verschiedene Signalkaskaden mittels Rekrutierung von TRAFs initialisiert, unter anderem die *mitogen activated protein kinase* (MAPK)-, die Phosphoinositol 3 Kinase (PI3K)-, die Phospholipase C γ (PLC γ)-Signalwege, aber auch der NF κ B-Signalweg (Bishop et al., 2007). Dabei spielt vorrangig der klassische NF κ B-Signalweg für die in dieser Arbeit untersuchten Fragestellungen die zentrale Rolle.

1.5.1 Allgemeine Aspekte der NF κ B Transkriptionsfaktoren

NF κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*) umfasst eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die verschiedene Mitglieder der NF κ B/Rel-Familie beinhaltet und in die transskriptionale Aktivierung von entzündungsrelevanten Genen involviert ist (Baud and Karin, 2001). Unter anderem findet eine vermehrte Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle statt, z.B. von Zytokinen und immunregulatorischen Proteinen, die wichtig für eine zelluläre Immunantwort auf Inflammation, Zellstress oder Gewebeerstörung sind (Ghosh and Karin, 2002). Dabei dient in dieser Arbeit die Interleukin-8 (IL-8) - Induktion dem Nachweis einer TNFRSF-Rezeptor-Aktivierung über den NF κ B-Signalweg.

In Säugetierzellen sind fünf Proteine der NF κ B-Familie bekannt: NF κ B1 (p105), NF κ B2 (p100), RelA (p65), RelB und c-Rel. Im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern der NF κ B/Rel-Familie werden NF κ B1 und NF κ B2 als Proformen synthetisiert (p105 und p100) und proteolytisch zu ihren aktiven Formen p50 und p52 prozessiert (Oeckinghaus et al., 2011). Alle fünf Proteine liegen als homodimere oder heterodimere Proteine vor, die eine Rel-homologe-Domäne (RHD) N-terminal aufweisen, die essentiell für die Dimerisierung, für die Bindung an die DNA und an die I κ B-Proteine (*Inhibitor of kappa B*) ist (Hayden and Ghosh, 2004). I κ B-Proteine binden NF κ B/Rel-Dimere in ruhenden Zellen im Zytosol und verhindern somit deren Translokation in den Nukleus. Die Bindung wird über die Interaktion der C-terminal gelegenen Ankyrin-Wiederholungen der I κ B-Proteine, die charakteristisch für diese Gruppe sind, und der RHD-Domäne der NF κ B-Proteine vermittelt. Dadurch wird die Kernlokalisationssequenz der RHD-Domäne maskiert und somit die Translokation der NF κ B-Proteine in den Nukleus verhindert (Hoesel and Schmid, 2013). NF κ B1(p105/50) und NF κ B2 (p100/52) kommt dabei eine Doppelfunktion zu. Zum einen gehören die Vorläuferproteine NF κ B1(p105) und NF κ B2(p100) funktionell zur I κ B-Proteinfamilie, binden selbst über Ankyrin-Wiederholungen Proteine der NF κ B-Familie und verhindern somit die Aktivierung des NF κ B-Signalweges. Zum anderen, nach proteolytischer

Prozessierung in ihre aktiven Formen NF κ B1(p50) und NF κ B2(p52), aktivieren sie den NF κ B-Signalweg durch Dimerisierung mit anderen NF κ B-Proteinen (Beinke and Ley, 2004). Zwei Signalwege führen zur Translokation von NF κ B-Dimeren vom Cytoplasma in den Zellkern, die durch eine Vielzahl von endogenen und exogenen Stimuli, wie auch durch physikalischen und chemischen Stress initialisiert werden: Der klassische und alternative NF κ B-Signalweg (Hayden and Ghosh, 2008).

1.5.1.1 Der klassische NF κ B-Signalweg

Die Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalwegs (nuclear-factor-kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells) erfolgt über die Degradation der inhibitorischen I κ B-Proteine. Voraussetzung dafür ist die vorherige Phosphorylierung der I κ B-Proteine durch den I κ B-Kinase-Komplex (IKK) (Yamamoto and Gaynor, 2004). Der IKK besteht aus zwei katalytischen Einheiten, IKK α und IKK β , sowie einer regulatorischen Untereinheit IKK γ /NEMO (Mitchell et al., 2016).

Verschiedene inflammatorische Trigger (z.B. Lipopolysaccharide (LPS)), sowie Rezeptoren der TNFRSF führen zur Aktivierung des IKK mittels Phosphorylierung. Dadurch kann der Kinasekomplex an die inhibitorischen I κ B-Proteine binden, diese ebenfalls phosphorylieren und somit für die ubiquitinabhängige Degradation durch Proteasomen markieren. Die NF κ B-Dimere, insbesondere NF κ B1(p50)-RELA und NF κ B1(p50)-c-REL, können somit nach Inaktivierung der I κ B-Proteine durch Demaskierung der Kernlokalisationssequenz ihrer Funktion als Transkriptionsfaktor über die Bindung an κ B-Bindungsstellen der jeweiligen Gene nachkommen (Bonizzi and Karin, 2004; Sun, 2017). Die Aktivierung des klassischen NF κ B-Signalweges und somit NF κ B-abhängiger Promotoren erfolgt innerhalb weniger Minuten. Durch die vermehrte NF κ B-induzierte Expression inhibitorischer I κ B-Proteine entsteht dabei gleichzeitig ein negativer Feedback-Mechanismus (Hoffmann and Baltimore, 2006).

1.5.1.2 Der alternative NF κ B-Signalweg

NF κ B1 und NF κ B2 werden als Proformen (p105 und p100) synthetisiert (s. 1.4.1) und proteolytisch zu ihren aktiven Formen NF κ B1(p50) und NF κ B2(p52) gespalten. Während die Prozessierung von p105 zu p50 konstitutiv erfolgt, ist die Prozessierung von p100 zu p52 streng reguliert und signalabhängig (Beinke and Ley, 2004). Die inaktive Proform p100 liegt als Komplex mit RelB vor und unterdrückt die transskriptionale Aktivität von RelB funktionell wie I κ B-Proteine (Solan et al., 2002). Die Prozessierung von p100 und die daraus resultierende Freisetzung von RelB-p52 wird durch die NF κ B-induzierende Kinase (NIK), die wiederum IKK α aktiviert, katalysiert (Xiao et al., 2001). IKK α phosphoryliert p100 und markiert dieses so für die ubiquitinabhängige Prozessierung zu p52. Nach Prozessierung kommt es zur nukleären Translokation von RelB-p52 Heterodimeren, welche die transkriptionale Aktivierung von Genen induziert, die essentiell für die Entwicklung von B-Zellen und lymphatischen Organen sind (Sun, 2012). Ein wichtiger Unterschied zwischen dem klassischen und dem alternativen NF κ B-Signalweg ist also die Abhängigkeit des klassischen Signalweges von NEMO, wobei der alternative über die NIK induziert wird (Oeckinghaus et al., 2011). Ferner führt der alternative NF κ B Signalweg im Vergleich zum klassischen NF κ B-Signalweg zu einer langsameren, aber stetigen Aktivierung NF κ B-abhängiger Gene. Die Induktion des alternativen NF κ B-Signalweges erfolgt unter anderem durch Rezeptoren der TNFRSF (Sun, 2017).

1.5.2 CD40 bedingte NF κ B-Signalweg Aktivierung

Da der TNFRSF-Rezeptor CD40 am zytoplasmatischen Anteil selbst keine Kinasefunktion aufweist, muss dieser mit anderen zellulären Proteinen interagieren, um Signalkaskaden zu initialisieren. Dabei spielen 4 Mitglieder der TRAF-Familie eine entscheidende Rolle (1,2,3 und 6) (Bishop et al., 2007). Für die Aktivierung des klassischen wie auch des alternativen NF κ B-Signalweges spielt vor allem TRAF2 eine entscheidende Rolle, wobei es selbst keine Kinase-Aktivität besitzt, sondern CD40 mit weiteren Effektormolekülen verknüpft

(Takeuchi et al., 1996). So aktiviert TRAF2 einerseits die E3-Ligasen cIAP1 und cIAP2, was essentiell für die IKK-Aktivierung und somit auch für die Initialisierung des klassischen NF κ B-Signalweges ist, wobei hinzuzufügen ist, dass auch TRAF1 und TRAF6 unabhängig vom TRAF2 den IKK-Komplex aktivieren können (Bishop et al., 2007).

Andererseits kommt es durch die Bindung von TRAF2 auch zur Aktivierung des alternativen NF κ B-Signalweges, und zwar über die Regulation von NIK. Da NIK durchgehend aktiv ist, wird der alternative NF κ B-Signalweg über die zytoplasmatische Konzentration von NIK reguliert (Hayden and Ghosh, 2012).

NIK wird ohne CD40-Aktivierung konstitutiv durch TRAF3 für die proteasomale Degradation ubiquitiniert. Durch die CD40 Rezeptoraktivierung wird TRAF2 an den Rezeptor rekrutiert und bindet cIAP1 und cIAP2, wodurch unter anderem auch TRAF3 ubiquitiniert und degradiert wird. Dadurch steigt die zytoplasmatische Konzentration von NIK und es kommt zur Aktivierung des alternativen NF κ B-Signalweges (Liao et al., 2004).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Zielsetzung dieser Arbeit war die biotechnologische Herstellung CD40-spezifischer IgG1-Antikörper, die Fc γ R-unabhängig agonistisch wirken. Durch die Verknüpfung am C-terminalen Teil der Fc-Domäne mit scFv-Fragmenten sollte eine für die TNFRSF-Rezeptor-Clusterbildung notwendige Immobilisation über verschiedene Oberflächenantigene gewährleistet werden (CD70, BCMA, PDL1), die die aktivierende Fc γ R-Antikörper-Interaktion ersetzen soll. Dabei sollte untersucht werden, inwieweit sich die Antikörper-Fusionsproteine erfolgreich klonieren und stabil produzieren lassen. Ferner soll mittels *in vitro* Versuchen geklärt werden, ob das Prinzip einer Fc γ R-unabhängigen, Tumorantigen-spezifischen CD40-Aktivierung experimentell bestätigt werden kann.

2 Material

2.1 Chemikalien, Reagenzien und Zellkulturmedien

1kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)
2-Propanol	VWR International S.A.S, Fontenay-sus-Bois (FRA)
6x DNA Loading Dye	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)
Acrylamid (30%)	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
ABTS	Roche, Mannheim (GER)
ABTS-Puffer	Roche, Mannheim (GER)
Agar	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Agarose	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Anti-FLAG® M2 Agarose Beads	Sigma-Aldrich, Steinheim (GER)
Ammoniumpersulfat (APS)	AppliChem, Darmstadt (GER)
Ampicillin	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Blue Protein Standard (Broad Range)	New England Biolabs, Frankfurt (GER)
Bromphenolblau (5%)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA (USA)
Coelenterazin (Luciferase Substrat)	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Di-Natriumhydrogenphosphat	AppliChem, Darmstadt (GER)
DPBS (Dulbeco's Phosphate Buffered Saline)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (GER)
Essigsäure	Sigma-Aldrich, Deisenhofen (GER)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Ethanol (70%)	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Glycerol (86%)	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Glycin	AppliChem, Darmstadt (GER)
Fetales Kälberserum (FCS)	Life Technologies Limited, Paisley

	(UK)
Hefeextrakt	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis	GE Healthcare, Garching (GER)
Methanol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen (GER)
Midori Green Advance DNA Stain	Nippon Genetics Europe GmbH, Düren (GER)
Milchpulver	Sigma-Aldrich, Deisenhofen (GER)
Natriumazetat	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Natriumdihydrogenphosphat	AppliChem, Darmstadt (GER)
Natriumchlorid	AppliChem, Darmstadt (GER)
Natriumhydroxid	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
NEBuffer 1 (Klonierung)	New England Biolabs, Frankfurt (GER)
NEBuffer 4 (Klonierung)	New England Biolabs, Frankfurt (GER)
Penicillin/Streptomycin (100 x)	Sigma-Aldrich, Steinheim (GER)
Pepton	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
RPMI 1640 Medium	Sigma-Aldrich, Steinheim (GER)
Salzsäure	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Silbergelmarker (Low Molecular Weight)	GE Healthcare, Garching (GER)
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
SOC Outgrowth Medium	New England Biolabs, Frankfurt (GER)
Tetramethylethyldiamin, TEMED	Sigma-Aldrich, Deisenhofen (GER)
Tris	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Trypsin/EDTA-Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim (GER)
Tween-20	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen (GER)

2.2 Enzyme

Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP)	New England Biolabs, Frankfurt (GER)
Restriktionsendonukleasen (Klonierung)	New England Biolabs, Frankfurt (GER)
RNAse A	Invitrogen, Carlsbad, CA (USA)
T4-Ligase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)

2.3 Antikörper

Anti-Flag (M2)	Maus IgG1, (monoklonal)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen (GER)
Anti-Maus PE	Ziege polyklonal	LI-Core, Lincoln, NE (USA)
Anti-Human PE CD274 (B7-H1, PD-L1)	Mouse IgG1, (monoklonal)	BioLegend, San Diego, CA (USA)
Isotypkontrolle PD-L1	Mouse IgG2B, (monoklonal)	R&D Systems, Minneapolis, MN (USA)
Anti-Human PE CD269 (BCMA)	Mouse IgG1, (monoklonal)	BioLegend, San Diego, CA (USA)
Isotypkontrolle BCMA	Mouse IgG2A, (monoklonal)	R&D Systems, Minneapolis, MN (USA)
Anti-Human FITC CD70	Mouse IgG1, (monoklonal)	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ (USA)
Isotypkontrolle CD70	Mouse IgG1 κ , (monoklonal)	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ (USA)

2.4 Kommerzielle Kits

KOD Hot Start DNA Polymerase	EMD Millipore Corp., Billerica, MA (USA)
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up	Marchery Nagel GmbH & Co KG, Düren (GER)

OpTEIA IL-8 ELISA Kit	BD Bioscience, Heidelberg (GER)
PageSilver™ Silver Staining Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)
Pure Yield Plasmid Miniprep/Midiprep System	Promega, Mannheim (GER)
Rapid DNA Ligation	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)

2.5 Geräte, Verbrauchs- und Labormaterialien

Centrifuge Bottles Polycarbonate (50ml)	Beckman Coulter, Brea (CA)
CO ₂ -Inkubator HERAccl 150i	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)
Dialyseschlauch "Visking", MWCO	Carl Roth, Karlsruhe
Eismaschine AF 124	Scotsman, Mailand (I)
Elektrophoresis Power Supply Consort (300-500V) E835	PeqLab, Erlangen (GER)
ELISA-Platten (95-well, high binding)	Greiner Bio-One, Frickenhausen (GER)
Phomo-LUminometer	Anthos Labtec, Krefeld, (GER)
Eppendorf Pipetten (0,5-10µl; 2-20µl; 20-200µl; 100-1000µl)	Eppendorf, Hamburg (GER)
Erlenmeyerkolben (250ml)	Schott Duran, Wertheim/Main (GER)
F-Platte 96 Well Mikroplatte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (GER)
Gefrierschrank -80° REVCO ULTIMA	BADER, Würzburg (GER)
Gelkämme	PeqLab, Erlangen (GER)
Gene Quant pro (RNA/DNA Calculator)	GE Healthcare Life Sciences Europe GmbH, Freiburg (GER)
Glaspasteurpipetten	Brand, Wertheim (GER)
Glaspipetten	Brand, Wertheim (GER)

Heizblock	PeqLab, Erlangen (GER)
Heizblock	Thermo Duox, Wertheim (GER)
Intas Gel iX20 Imager	Intas Science Imaging Instruments, Göttingen (GER)
J2-HS Zentrifuge	Beckman Coulter, Brea (CA)
Kryogefäß (2ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen (GER)
Kühlschrank TC 604-W	Tritec, Hannover (GER)
Lichtmikroskop EVOS XL	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)
LUmo Luminometer	Anthos Labtec, Krefeld, (GER)
Messbecher 100ml	VITLAB GmbH, Großostheim (GER)
Mikrowelle (Techno Star MWN 20 S)	Venalisia Import GmbH, Koesching (GER)
Multipipette M4 (1µl-10ml)	Eppendorf, Hamburg (GER)
Multitron Standard Inkubationsschüttler	Infors AG, Bottmingen (CH)
Neubauer Zählkammer	Hartenstein, Würzburg (GER)
Nitril-Handschuhe	Paul Hartmann AG, Heidenheim (GER)
Nitrozellulosemembran, 0,2µM Porengröße	Whatman, Dassel (GER)
Orbital Incubator SI500	Stuart Equipment, Staffordshire (UK)
Parafilm M (38m x 10cm)	Hartenstein, Würzburg (GER)
PCR Flex Cyclcr	Analytik Jena, Jena (GER)
PCR Personal Thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen (GER)
PerfectBlue Horizontal Minigelsystem	PeqLab, Erlangen (GER)
Petrischalen (100/20, 35/20mm)	Greiner Bio-One, Frickenhausen (GER)
pH-Meter	Mettler Toledo, Gießen (GER)

Pipettenspitzen	Greiner Bio-One, Kremsmünster (AUT)
Pipettus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt (GER)
Polypropylenröhrchen 15ml, 50ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster (AUT)
Pumpe (N86KN.18)	KNF Neuberger, Freiburg (GER)
Schüttler/Kippwippe	Hartenstein, Würzburg (GER)
Schwarze 96-well Mikroplatten	Greiner Bio-One, Frickenhausen (GER)
Steril Werkbank	Heraeus Group, Hanau (GER)
Sterilfilter (0,2 µm)	Sarstedt, Nümbrecht (GER)
Stromquelle EPS 301	GE Healthcare Bo-Science AB, Garching (GER)
TC Schale 100, Standard	Sarstedt, Nümbrecht (GER)
Tischzentrifuge Accuspin Micro 17r	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)
Universalzentrifuge Heraeus Megafuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)
U-Platte 96 Well Mikroplatte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (GER)
UV Kontaktlampe Chroma 43	Vetter GmbH, Wiesloch (GER)
Vac® Man	Promega, Mannheim (GER)
Vertikales Doppelgelsystem Twin ExWS 452010-I/C	PeqLab, Erlangen (GER)
Vortexer L46	Gesellschaft für Laborbedarf GmbH, Würzburg (GER)
Waage (Sartorius Basic)	Sartorius AG, Göttingen (GER)
Waage TEE 150-I	Kern, Balingen (GER)

Waageschälchen	Hartenstein, Würzburg (GER)
Wasserbad Typ 3043	Köttermann, Würzburg (GER)
Wet-Blotkammer	PeqLab, Erlangen (GER)
Whatman-Papier	Hartenstein, Würzburg (GER)
Zellkulturflaschen T 175	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (GER)
Zellkulturplatten (145/20mm)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (GER)
Zellkulturschalen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (GER)
Zellschaber	Hartenstein, Würzburg (GER)
Zentrifuge Heraeus PICO 17	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)
Zentrifugenröhrchen 150ml	Nalge Nunc International, Rochester, NY (USA)

2.6 Puffer und Lösungen

Assay Diluent (ELISA)	1x 10 % (v/v)	PBS FCS
Blotpuffer	0,025 M 0,192 M 20 % (v/v)	Tris Glycin Methanol pH 8,3
Coating Buffer (ELISA)	0,1 M	Natriumcarbonat pH 9,5
Einfriermedium (Zellkultur)	10 %	DMSO in FCS
GpL-Messmedium	0,5 % 1% 1x	FCS Pen/Strep RPMI 1640
Laemmli-Puffer (SDS-PAGE, 4 x)	8 % (w/v)	SDS

	10 % 40 % 0,2 M 0,04 %	β -Mercaptoethanol Glycerol Tris Bromphenolblau
Laufpuffer (SDS-PAGE)	0,05 M 0,38 M 0,004 M	Tris Glycin SDS pH 8,3
LB Agar Medium	1x 1,5 % (w/v)	5x LB Medium Agar Agar in dH ₂ O
LB Medium (5-fach konzentriert)	10 g/l 5 g/l 10 g/l	Pepton Hefeextrakt Natriumchlorid
PBS (Phosphate buffered saline)	0,02 M 0,7 % (w/v)	Natrium-Phosphat Natriumchlorid pH 7,2
PBST	1 x 0,05 % (v/v)	PBS Tween-20
Puffer I (Mini-DNA-Präparation)	50 mM 10 mM 0,1 mg/ml	TRIS/ HCl, pH 7,5 EDTA, pH 8,0 RNase A
Puffer II (Mini-DNA-Präparation)	0,2 M 1 % (w/v)	Natriumhydroxid SDS
Puffer III (Mini-DNA-Präparation)	3 M	Natriumacetat pH 4,8
Sammelgelpuffer (SDS-PAGE)	0,5 M 0,015 M	Tris SDS pH 6,8

TAE-Puffer	2 M 1 M 0,1 M	Tris Essigsäure EDTA pH 8,3
TBS (Tris buffered saline)	0,02 M 8 % (w/v)	Tris NaCl pH 7,6
TBST in Milch	1 x 0,05 % (v/v) 5 % (w/v)	TBS Tween-20 Magermilch
Trenngelpuffer (SDS-PAGE)	1,5 M 0,015 M	Tris SDS pH 8,8

2.7 Zellen und Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten eukaryotischen Zelllinien waren bereits in der Abteilung für Molekulare Innere Medizin von Prof. Dr. Wajant vorhanden.

HEK293	Embryonale Nierenzellen	Institutseigener Vorrat
HT1080	Fibrosarkomzellen	Institutseigener Vorrat
HT1080-CD40	Fibrosarkomzellen	Institutseigener Vorrat

Für die Klonierung sowie der DNA-Präparation wurden NEB 5- α Competent *E.coli* (High Efficiency) genutzt, die von der Firma New England Biolabs (Frankfurt) bezogen wurden.

2.8 Plasmide

Die aufgeführten Plasmide waren bereits in der Abteilung für Molekulare Innere Medizin (Leitung: Prof. Dr. Wajant) vorhanden und wurden mit den eigens klonierten Plasmiden, die unter 3.1 aufgeführt sind, für die Produktion der jeweiligen Antikörper genutzt.

- 1.) anti-CD40(C)-F-VL-pCR3
- 2.) anti-CD40(C)-F-VH-N297A-pCR3
- 3.) anti-CD40(C)-F-VL-Gaussia-pCR3
- 4.) anti-CD40(C)-F-VH-N297A-scFv:anti-PDL1(Avelumab)-pCR3

3 Methoden

3.1 Klonierung

Es erfolgte der Restriktionsverdau des pCR3-Expressionsvektors und des über eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) gewonnenen Inserts mit entsprechenden Enzymen (s. Tab. 2) sowie die Ligation derselben. Der für die Klonierung der in dieser Arbeit untersuchten Antikörperfusionsproteine verwendete pCR3-Expressionsvektor (Invitrogen, Karlsruhe (GER)) enthält ein Flag-Tag, einzelne Schnittstellen für die jeweiligen Restriktionsenzyme und eine N-terminale Ampicillinresistenz zur Klonselktion. Die vollständigen DNA-Sequenzen der klonierten Antikörper-Fusionsproteine sind im Anhang aufgeführt. Für die scFv-Fragmente wurden synthetische Gene, die aus Aminosäuresequenzen bereits publizierter Antikörperklone abgeleitet wurden, verwendet: 2H5 (aCD70), C11D53 (aBCMA), Avelumab (Ave, PDL1). Im Nachfolgenden wird auf die Bezeichnung der Klone verzichtet.

3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion

Für den PCR-Ansatz der Inserts wurden folgende Reagenzien verwendet: 5 μ l 10 x Buffer for Hot Start DNA-Polymerase [200 U], 5 μ l dNTPs [2 mM], 3 μ l $MgSO_4$ [25 mM], je 1,5 μ l forward- und reverse-Primer, 1 μ l DNA (1:100 Verdünnung), 32 μ l dH_2O und 1 μ l Polymerase. Die PCR erfolgte im PCR Thermocycler (Analytic Jena, Flex Cycler). Die 2-minütige Denaturierung erfolgte bei einer Temperatur von 95 °C, die 50-sekündige Primerhybridisierung bei 50 °C und die 30-sekündige Elongation bei 70 °C, wobei insgesamt 25 PCR-Zyklen stattfanden.

3.1.2 Bandenaufreinigung der PCR-Produkten

Für die Klonierung war es nötig, die PCR-Produkte mittels elektrophoretischer Auftrennung auf Agarosegelen der Länge nach aufzureinigen. Dafür wurden die Proben auf ein 1 % Agarosegel (0,7 g Agarose in 60 ml 1 x TAE bzw. 1,7 g Agarose in 160 ml 1 x TAE), welches mit 3 μ l bzw. 9 μ l Midori Green Advanced DNA Stain versetzt wurde, aufgetragen, um diese elektrophoretisch

aufzutrennen. 8 μl Marker (GeneRuler 1 kb DNA Ladder) wurden als Referenz für die Basenpaargröße zusätzlich aufgetragen. Die Elektrophorese verlief bei 100 V für 10-20 min in 1 x TAE Puffer. Daraufhin wurden die Gelbanden unter UV Licht mittels Skalpell extrahiert und in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt, um diese aufzureinigen. Die Aufreinigung dient dazu, alle überschüssigen Komponenten der PCR von der DNA zu trennen. Dafür wurde 120 μl NT (Bindungspuffer) zu den 2 ml Eppendorf-Gefäßen hinzugefügt. Die Auflösung des Gels erfolgte bei 42-52 °C mittels Heizblock, wodurch die gelöste DNA dann in einen Filter mit Collection Tubes überführbar war und bei 11000 rpm für 10 s zentrifugiert wurde. Der entstandene Überstand wurde verworfen und es wurden 600 μl NT3 (Waschpuffer) hinzugefügt und resuspendiert. Nach erneuter 10-sekündiger Zentrifugation bei 11000 rpm, wurde der entstandene Überstand verworfen und die sich im Filter befindende DNA für 2 min bei 11000 rpm trocken zentrifugiert. Nach Überführung der Säule auf ein weiteres 1,5 ml Eppendorf Gefäß und nach Hinzufügen von 15-50 μl NE (Elutionspuffer), je nach Bandendicke, wurde das Eppendorf-Reaktionsgefäß bei 13000 rpm für 1 min zentrifugiert.

3.1.3 Restriktionsverdau und Dephosphorylierung

Nach erfolgreicher Gel-Aufreinigung erfolgte der Restriktionsverdau der PCR-Produkte sowie des pCR3-Expressionsvektors mittels spezifischer Restriktionsenzyme und die Dephosphorylierung der Vektoren. Durch den Restriktionsverdau der PCR-Produkte und des pCR3-Expressionsvektors entstanden an den Enden Einzelstrangüberhänge, die eine einfache Ligation ermöglichten. Für den Restriktionsverdau-Ansatz wurden folgende Substanzen verwendet: 5 μl 10x Puffer (NEB), 5 μl DNA, 38 μl dH₂O und je 1 μl für jedes Restriktionsenzym. Die Inkubation erfolgte 1,5 h bei 37 °C, wobei bei den Vektoren nach 1 h 1 μl CIP (calf intestine alkaline phosphatase) hinzugegeben wurde, um durch Dephosphorylierung das Aneinanderlagern zweier kompatibler Enden eines Vektorfragmentes zu verhindern.

3.1.4 Vektoraufreinigung

Auch für die Vektoren erfolgte nach dem Restriktionsverdau das Auftragen auf ein 1 % Agarosegel und die elektrophoretische Auftrennung nach Größe sowie die Aufreinigung nach gleichem Prozedere. Einziger Unterschied bestand in der Aufreinigung der Vektoren mittels 400 µl NT (Bindungspuffer) zum Lösen der Gelbanden bei 42-52 °C auf dem Heizblock.

3.1.5 Ligation

Die Ligation von Vektor und Insert erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Für den Ligations-Ansatz wurden folgende Reagenzien verwendet: 3 µl Insert, 1 µl Vektor, 4 µl 5x Rapid-Ligation-Buffer, 1 µl T4 DNA-Ligase [5 U/µl], und 11 µl dH₂O.

3.1.6 Hitzeschock-Transformation klonierter Vektoren in kompetente Zellen

Für den Transformations-Ansatz wurden 20 µl NEB 5 alpha Zellen (Competent E. coli high efficiency) mit 2 µl des Ligations-Ansatzes für 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte die 42-sekündige Inkubation bei 42 °C mittels Heizblock und die anschließende erneute Inkubation auf Eis für 30 s. Dem Ansatz wurden 250 µl SOC-Medium hinzugefügt und dieser 1 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurden 120-130 µl des Transformations-Ansatzes auf LB-Ampicillin-Agarplatten ausplattiert und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

3.1.7 Plasmid-Minipräparation

Für die Isolierung der einzelnen Plasmide aus den Bakterien wurden für den Mini-Ansatz, am Folgetag 6 Klone mittels Pipettenspitze von den LB-Ampicillin-Agarplatten gepickt und in je 2 ml LB-Medium, welchem Ampicillin (1:1000 Verdünnung) zugesetzt wurde, in 15 ml Falcons angeimpft. Es erfolgte die Inkubation über Nacht unter antibiotischer Selektion bei 37 °C im Inkubationsschüttler.

Nach erfolgter Inkubation über Nacht wurde der 2 ml Mini-Ansatz in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt und für 1 min bei 13300 rpm zur Pelletierung der Bakterien abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl S1 Puffer (Resuspensionspuffer) mittels Vortexer resuspendiert. Es erfolgte das Hinzufügen von 100 µl S2 Puffer (Lysispuffer) und die Invertierung. Zur Neutralisation wurden 100 µl S3 Puffer (Neutralisationspuffer) hinzugefügt und erneut invertiert. Nach erfolgter Neutralisation und 5 min Inkubation auf Eis wurden die Minis bei 13300 rpm wiederum abzentrifugiert, um die verbliebenen Proteine und Zellbestandteile von der Plasmid-DNA zu trennen. Für die einzelnen Minis wurden 1,5 ml Eppendorf-Gefäße mit 250 µl 70 %igem, eiskaltem Isopropanol vorbereitet, in welche der Überstand der abzentrifugierten Minis überführt wurde, um die DNA zu fällen. Danach erfolgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 14000 rpm bei einer Temperatur von 4 °C. Der entstandene Isopropanolüberstand wurde verworfen und das Pellet in 250 µl 70 %igem, eiskaltem Ethanol resuspendiert und 5 min bei 13300 rpm und Raumtemperatur abzentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde verworfen und das Pellet im 1,5 ml Eppendorf-Gefäß für 10-15 min auf dem Heizblock bei 42-45 °C getrocknet. Die Lösung der getrockneten DNA erfolgte mit 20 µl sterilem dH₂O.

3.1.8 Kontrollverdau

Nach Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte ein Kontrollverdau mit Restriktionsendonukleasen um die erfolgreiche Klonierung zu prüfen. Für den Kontrollverdau wurden folgende Reagenzien für den Mastermix verwendet: 2 µl Puffer (NEB), 3 µl der in dH₂O gelösten DNA, je 0,5 µl Restriktionsenzym und 14 µl dH₂O. Mittels Agarosegel und abermals erfolgter elektrophoretischer Auftrennung konnten die einzelnen Klone nach ihrer Positivität für die Midi-Präparation beurteilt werden.

3.1.9 Midipräparation

Um eine ausreichende Menge an Plasmid-DNA, die für die jeweiligen Antikörper-Fusionsproteine kodiert, zur späteren Transfektion von

eukaryontischen Zellen (3.2.2) zu generieren, erfolgte die Midipräparation. Für den Midi-Ansatz wurden 100 µl der Mini-Bakterienkultur, 150 ml 1 x LB-Medium und 150 µl Ampicillin (1:1000 Verdünnung) in einen Erlenmeyerkolben gegeben. Es erfolgte die Inkubation unter antibiotischer Selektion über Nacht bei 37 °C im Inkubationsschüttler.

Nach erfolgter Inkubation über Nacht wurde zunächst eine Dauerkultur der Bakterienkultur angesetzt. Dafür wurden 200 µl Glycerol mit 800 µl Bakterienkultur in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und bei -80 °C weggefroren. Der Rest der Bakterienkultur wurde in 150 ml Zentrifugengefäße überführt und bei 5000 rpm für 10 Minuten abzentrifugiert (J2-HS Zentrifuge, Beckmann Coulter). Der entstandene Überstand wurde verworfen und die Plasmide aus dem Bakterienpellet isoliert. Dafür wurde das Bakterienpellet in 8 ml Resuspensionspuffer mittels Vortexer gelöst, in ein 50 ml Zentrifugengefäß überführt und mit 8 ml Lysispuffer versetzt und invertiert. Nach erfolgter Invertierung wurden 9 ml Neutralisationspuffer dazugegeben und invertiert. Nach 10 min Zentrifugation bei 10000 rpm wurde der Überstand in ein Vakuumsauggerät (Vac-Man®, Promega) mittels Filterprozess überführt. Dabei wurde zum einen ein *Lysate Clearing Column* genutzt, um Zellüberreste herauszufiltern und eine weitere *DNA Binding Column*, welche die DNA nach Durchlaufen des Überstandes durch die *Lysate Clearing Column* auffängt. Nachdem der komplette Überstand beide Filter durchlaufen hatte, wurde die *Lysate Clearing Column* entfernt und der *DNA Binding Column* 5 ml *Endotoxin removal Puffer* beigefügt. Nach erneutem Absaugen erfolgte das Hinzufügen von 20 ml Waschpuffer und das erneute Absaugen. Daraufhin erfolgte die Elution der DNA mit 400 µl dH₂O und die DNA-Konzentrationsbestimmung mittels *Gene Quant pro RNA/DNA Calculator* in einer 1:100 Verdünnung. Dies erfolgte durch Quantifizierung der optischen Dichte der DNA. Nukleinsäuren weisen ein anderes Absorptionsspektrum von UV-Licht auf als Proteine, sodass durch das Verhältnis der verschiedenen Absorptionsspektren auf die Konzentration und Reinheit der Plasmide mittels Photometer geschlossen werden konnte.

3.1.10 Sequenzierung der Proben

Zur Validierung der klonierten DNA-Sequenzen wurden 20 µl [100 ng/ml] zur Firma GATC Biotech (Köln (GER)) verschickt, die diese sequenzierten. Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden mit exPASy ausgewertet. So konnte die DNA-Sequenz kontrolliert und analysiert werden.

3.2 Zellkultur

3.2.1 Kultivierung adhärenter Zelllinien

Alle Verfahren der Zellkultur erfolgten unter sterilen Bedingungen in einer Zellkulturwerkbank. Alle verwendeten Materialien und Lösungen waren steril. Die in dieser Dissertationsarbeit verwendeten Zelllinien wurden in RPMI-1640 Medium mit 10 %igem FCS (fetales Kälberserum), welches vorher für 30 min bei 55 °C hitzeinaktiviert wurde, in T175-Zellkulturflaschen bei einer CO₂ Konzentration von 5 % und bei 37 °C im Inkubator kultiviert. Je nach Proliferationsrate erfolgte das Splitten, die Ausdünnung der Zellen. Dafür wurden die Zellen mittels 3 ml 1 x Trypsin/EDTA in PBS für 5-10 min inkubiert, mittels Medium geerntet, in 50 ml Falcons überführt und 4 min bei 1200 rpm abzentrifugiert. Der Zellkulturüberstand wurde verworfen und das Zell-Pellet in 10 ml Medium (RPMI-1640, 10 % FCS) resuspendiert. Für die HEK293-Zellen erfolgte das Splitten im Verhältnis 1:5, für die HT1080- bzw. HT1080-CD40-Zellen im Verhältnis 1:10. Von jeder Zelllinie wurden zur Sicherheit einige Zellen in Kryoröhrchen weggefroren. Hierfür wurden die anderen 4:5 bzw. 9:10 der Zellen in 50 ml Falcons überführt und 4 min bei 1200 rpm abzentrifugiert. Der Zellkulturüberstand wurde abgesaugt und das Zell-Pellet in 1 ml Einfriermedium resuspendiert (FCS, 10 % DMSO), in die Kryoröhrchen überführt und bei -80 °C weggefroren.

Für die jeweiligen Experimente wurden die Zelllinien entsprechend den Experimenten ausgesät. Hierfür wurden die Zellen ebenso abtrypsinisiert und abzentrifugiert wie beschrieben. Die Resuspension des Zellpellets erfolgte in 20-30 ml Medium (RPMI-1640 10 % FCS, 1% Pen/Strep). Zur Zellzählung in einer Neubauer-Zählkammer wurden 10 µl der Zellsuspension verwendet.

3.2.2 Produktion der Fusionsproteine

Für die Transfektion der HEK293-Zellen zur Produktion der Fusionsproteine wurden die Zellen auf 15 cm Zellkulturplatten (Greiner) ausgesät und bei 37 °C inkubiert. Nach Erreichen der Konfluenz wurden 2 ml des Transfektionsansatzes in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße angesetzt: 2 ml Medium (RPMI-1640, 1 % Pen/Strep), 6 µg Plasmid-DNA je VH und VL und 36 µl PEI (Verhältnis 1:3 zur Plasmid-DNA). Während der Inkubation des Transfektionsansatzes für 10 min wurde das auf den Zellkulturplatten befindliche Medium (RPMI-1640, 10 % FCS) gegen serumfreies Medium (RPMI-1640, 1 % Pen/Strep) gewechselt ohne die auf den Zellkulturplatten befindlichen Zellen abzulösen. Nach tropfenweiser Zugabe des Transfektionsansatzes auf die Zellen, wurden diese in den Inkubator gestellt. Nach 12-15 h Inkubation erfolgte ein erneuter Wechsel des Mediums (RPMI-1640, 2 % FCS, 1 % Pen/Strep). Es erfolgte die erneute Inkubation im Inkubator bei 37 °C für 5-7 Tage. In dieser Zeit sollten die HEK293-Zellen die Antikörper bzw. -Fusionsproteine produzieren und in den Zellüberstand abgeben. Danach wurde der Überstand in 50 ml Falcons überführt und für 10 min bei 4000 rpm abzentrifugiert, um im Überstand befindliche Zellreste zu entfernen. Der Überstand mit den jeweiligen Antikörper-Fusionsproteinen wurde in 15 ml Falcon (Greiner) überführt und bei 4 °C gelagert.

3.3 Proteinbiochemie

3.3.1 Westernblot

3.3.1.1 SDS-Page

Zur Kontrolle der Produktion sowie zur Konzentrationsbestimmung der produzierten Fusionsproteine wurden diese nach ihrem Molekulargewicht mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) aufgetrennt. Die Gele für die SDS-Page setzen sich aus einem Trenngel (12 %) und einem Sammelgel (6 %) zusammen. Die Lösung für das Trenngel besteht

für ein ein Gel aus: 4,4 ml 30 % Acrylamid, 2,75 ml Trenngelpuffer, 3,9 ml dH₂O, 187 µl 10 % APS, 15,4 µl TEMED). Dieses wurde als erstes in ein Doppelgelsystem gegeben. Um sowohl einen geraden Abschluss des Trenngels als auch Blasenfreiheit zu gewährleisten, wurde das Trenngel mit Isopropanol überschichtet. Nach Polymerisierung des Trenngels wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel auf das Trenngel gegeben. Die Sammelgellösung besteht für 1 Gel aus: 1,4 ml 30 % Acrylamid, 1,75 ml Sammelgelpuffer, 3,8 ml dH₂O, 84 µl 10 % APS, 7 µl TEMED. Vor der Polymerisierung des Sammelgels wurde ein Geltaschenkamm eingesetzt. Zum einfacheren Pipettieren der Proben in die Geltaschen wurde dem Sammelgel zusätzlich 30 µl 5 % Bromphenolblau beigefügt.

15 µl der Protein-Überstände wurden mit 5 µl 4 x Probenpuffer versetzt. Es erfolgte die Denaturierung mittels Heizblock bei 90 °C für 5 min. Anschließend wurden die Proben für 10 min bei 14000 rpm abzentrifugiert. Zur Ermittlung des Molekulargewichts wurde pro Gel eine Tasche mit 1-3 µl Marker befüllt. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde ein Proteinstandard (anti-Fn14(18D1)-IgG3-LC:GpL) mit vorab definierter Konzentration (200 ng, 100 ng, 50 ng) ebenfalls nach Zugabe von 4 x Probenpuffer und Denaturierung aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in SDS Laufpuffer (50 mM Tris, 380 mM Glycin, 4 mM SDS, pH 8,3) für 1:35 h, davon 30 min bei 90 V für das Durchlaufen des Sammelgels. Danach wurde die Spannung auf 120 V erhöht.

3.3.1.2 Blotten

Nach der Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht mittels Gelelektrophorese erfolgte die Übertragung auf eine Nitrocellulosemembran. Hierfür wurden Whatman-Papier sowie Nitrocellulosemembran in Blotpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % Methanol, pH 8,3) getränkt und dann in folgender Reihenfolge anliegend aufeinandergelegt: Anode Whatman-Papier, Nitrocellulosemembran, Gel, Whatman-Papier, Kathode. Dabei wurde bei der Schichtung stets darauf geachtet, dass es zwischen den einzelnen

Bestandteilen des „Sandwiches“ zu keiner Luftblasenbildung kam. Das Blotting erfolgte in einer Nasskammer bei 90 V, 400 mA und RT für 2:35 h in Blottpuffer.

3.3.1.3 Immundetektion

Nach erfolgtem Blotting wurden die unspezifischen Bindungsstellen der Nitrocellulosemembran blockiert. Dies erfolgte in PBST-Milch (1 x PBS, 5 % Magermilchpuffer, (v/v) Tween-20) für 1 h bei RT auf einem Rotations-Schüttler. Vor der Inkubation mit dem primären Antikörper wurde die Nitrocellulosemembran 3 x 15 min mit PBST gewaschen. Die Primär-Antikörper-Inkubation mittels M2-Antikörper (Anti-Flag-M2, 1:2000 in PBST + 0,025 % Natriumazid), der den FLAG-Tag bindet, welchen sowohl die VH- als auch die VL-Ketten der Fusionsproteine aufweist, erfolgte über Nacht bei 4 °C. Am darauffolgenden Tag erfolgte das erneute Waschen der Nitrocellulosemembran für 3 x 15 min in PBST. Daraufhin wurde die Sekundär-Antikörper-Inkubation (IRDye 800CW *goat polyclonal anti-mouse-IgG*, 1:100000 in PBST) für 1 h bei RT auf dem Rotations-Schüttler durchgeführt. Abschließend wurde die Quantität der Proteine mittels LICOR Odyssey®-System (LI-COR Biosciences, Lincoln (USA)) bestimmt und beurteilt, ob eine regelrechte Produktion der Fusionsproteine stattgefunden hat.

3.3.2 Gleichgewichtsbindungsstudien

Zur Bestimmung der Affinität der zu untersuchenden Antikörper an ihre zellständigen Antigene wurden Gleichgewichtsbindungsstudien durchgeführt. Dabei wurde sowohl die K_D der anti-CD40-Domäne der jeweiligen Antikörper-Fusionsproteine, als auch die der verschiedenen scFv-Domänen bestimmt. Hierfür wurden GpL (*Gaussia princeps Luciferase*)-Varianten der jeweiligen Antikörper-Fusionsproteine verwendet. Für die Affinitätsbestimmung der anti-CD40-Domäne der Antikörper-Fusionsproteine wurden 2×10^5 (pro Well) adhärent wachsende HT1080-CD40-Zellen und HT1080-Zellen in eine 24-Well-Platte im entsprechenden Medium (RPMI-1640, 10 % FCS, 1 % Pen/Strep) ausgesät und über Nacht im Inkubator kultiviert (5 % CO₂, 37 °C). Dabei wurden sowohl 12 Wells mit HT1080-CD40-Zellen für die totale

Bindung, als auch 12 Wells mit HT1080-Zellen für die unspezifische Bindung ausgesät. Es erfolgte zunächst die Abtrypsinierung mittels 3 ml 1 x Trypsin/EDTA in PBS und die Aufnahme in 9 ml Medium (RPMI-1640, 10 % FCS, 1 % Pen/Strep). Daraufhin wurden die Zellen bei 1200 rpm für 4 min abzentrifugiert und in 10 ml Medium (RPMI-1640, 10 % FCS, 1 % Pen/Strep) resuspendiert. Es erfolgte die Zählung der Zellen mittels Neubauer Zählkammer und das Aussäen der jeweiligen Zellanzahl wie beschrieben auf die 24-Well-Platte. Die Zellen wurden am nächsten Tag mit den jeweiligen GpL-Antikörper-Fusionsproteinen für 60 min inkubiert (5 % CO₂, 37 °C). Dabei wurde mit einer Startkonzentration von 10 µg/ml und einer 1:3 Titration vorgegangen. Nach der Inkubation erfolgte das zweimalige Waschen in eiskaltem PBS, um die ungebundenen Antikörper zu entfernen. Nach Entfernung des PBS wurden die Zellen in 50 µl Medium (RPMI-1640, 0,5 % FCS, 1 % Pen/Strep) aufgenommen und mittels eines 16 cm Zellkratzers abgekratzt und in eine 96-Well-Microplatte (*medium binding*) überführt. Es erfolgte die Zugabe von 25 µl Enzymsubstrat der Luciferase (BioLux gaussia luciferase assay Kit) in PBS mit einer Verdünnung von 1:1636, um die GpL Aktivität mittels Lumineszenz messen zu können. Die Lumineszenz-Messung der Proben und einer definierten Menge eines GpL-Standards erfolgte sofort nach Zugabe mittels Lumo-Luminometer (Anthos Lucy 2 Luminometer). Die K_D-Wert Bestimmungen der jeweiligen scFv-Domänen wurden mit transient transfizierten HEK293-Zellen durchgeführt. Dafür wurden die Zellen auf 100 x 20 mm Zellkulturschalen in entsprechendem Medium (RPMI-1640, 10 % FCS, 1% Pen/Strep) ausgesät und über Nacht inkubiert (5 % CO₂, 37 °C). Nach erreichter Konfluenz wurden 1 ml des Transfektionsansatzes in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße angesetzt: 1 ml Medium (RPMI-1640, 1 % Pen/Strep), 8 µg DNA 24 µg PEI (Verhältnis 1:3 zur DNA). Das Medium auf den HEK293-Zellen wurde ebenfalls auf das entsprechende Medium (RPMI-1640, 1 % Pen/Strep) gewechselt und die HEK293-Zellen mit den entsprechenden Rezeptor-kodierenden Plasmiden bzw. Leervektor-Kontrollen transfiziert (s 3.2.2). Am darauffolgenden Tag wurden die transfizierten HEK293-Zellen mit 2 ml 1 x Trypsin/EDTA in PBS abtrypsiniert und in 8 ml Medium (RPMI-1640,

10 % FCS, 1 % Pen/Strep) aufgenommen und bei 1200 rpm für 4 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 10 ml Medium (RPMI-1640, 10 % FCS, 1 % Pen/Strep) resuspendiert. Auch hier erfolgte die Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer. Für jede Gleichgewichtsbindungsstudie wurden 12 x 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße mit je 6×10^5 Zellen ausgesät, denen das Rezeptor-kodierende Plasmid transfiziert wurde (totale Bindung), sowie 12 x 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße mit je 6×10^5 Zellen, denen ein Leervektor-kodierendes Plasmid (VE12) transfiziert wurde (unspezifische Bindung). Daraufhin wurden die Zellen mit einer Startkonzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ der GpL-Antikörper-Fusionsproteine und einer Titration von 1:3 für 60 min inkubiert (5 % CO_2 , 37 °C). Anschließend erfolgte das 2-malige Waschen mit eiskaltem PBS. Hierfür wurden die Zellen für 1 min bei 14000 rpm abzentrifugiert, mit 1 ml eiskaltem PBS versetzt und gevortext. Anschließend wurde weiter verfahren wie bei den Bindungsstudien mit HT1080-/HT1080-CD40-Zellen.

Die spezifische Bindung ergab sich aus der Subtraktion der unspezifischen Bindung von der Totalbindung, woraus die Dissoziationskonstante K_D mittels GraphPad Prism 5.0 bestimmt wurde. Es wurden nur Graphen in die Auswertung genommen, bei denen der Determinationskoeffizient $R^2 > 0,96$ war. Dabei ist R^2 ein Maß für die Varianz.

3.3.3 Interleukin-8 Enzyme linked Immunsorbent Assays (IL-8 ELISA)

IL-8 ELISA Experimente dienen zur Bestimmung der Rezeptoraktivierung durch die jeweiligen Antikörper-Fusionsproteine. Dafür wurden HT1080-CD40-Zellen verwendet, die nach der durch den $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Signalweg vermittelten CD40-Aktivierung, die Produktion von IL-8 erhöhen. Die IL-8 Produktion/Sekretion der HT1080-CD40-Zellen wurde mittels kommerziellen Kits bestimmt. Hierfür wurden 2×10^4 Zellen pro Well in einem Volumen von 100 μl Medium (RPMI-1640, 10 % FCS, 1 % Pen/Strep) in eine 96-Well-Platte (*F-Bottom*) ausgesät und über Nacht kultiviert. Am darauffolgenden Tag erfolgte für jedes zu testende Konstrukt das Ansetzen einer Verdünnungsreihe in

Medium (RPMI-1640, 10 % FCS, 1 % Pen/Strep) in einer 96-Well-Platte (*U-Bottom*). Je nach Versuchsaufbau wurden den einzelnen Verdünnungsreihen 4×10^4 HEK293-Zellen pro Well, die mit den entsprechenden Rezeptor-kodierenden Plasmiden bzw. Leervektor-Kontrollen transfiziert (s 3.2.2) worden waren, beigefügt. Die Oberflächenexpression der transfizierten Rezeptoren wurde mittels FACS (s.3.3.4) überprüft. 100 μ l der Verdünnungsreihe wurde dann auf die 96-Well-Platte (*F-Bottom*) übertragen, nachdem zuvor das Kulturmedium abgenommen worden war. Es erfolgte eine Inkubation für 20 h.

Am selben Tag wurden 96-Well-ELISA-Platten mit 50 μ l/Well Capture-Antikörper beschichtet (1:350 in *Coating Buffer*) und über Nacht bei 4 °C gelagert. Am nächsten Tag erfolgte 3-maliges Waschen der ELISA-Platten mit PBST und anschließend wurden mit 200 μ l Assay Diluent (10 % FCS in PBS) unspezifische Bindungsstellen für 1 h bei RT geblockt. Nach 3-maligem Waschen in PBST wurden je 50 μ l der Zellüberstände sowie 50 μ l des Standards (2-0,5 ng/ml) zur genauen IL-8 Konzentrationsbestimmung, auf die ELISA-Platten übertragen und für 2 h bei RT inkubiert. Nach 5-maligem Waschen mit PBST wurden 50 μ l *Working Detector*, welcher den anti-IL8-Antikörper beinhaltet, pro Well aufgetragen und 1 h bei RT inkubiert. Nach der Bindung und abschließendem 5-maligem Waschen mit PBST wurden 100 μ l *Substrat-Puffer Reagent pro Well* beigefügt und bei einer Wellenlänge von 405 nm die IL8-Produktion ermittelt und über den Standard in ng/ml umgerechnet.

3.3.4 Durchflusszytometrie

Zur Überprüfung der Oberflächenexpression der Rezeptoren der transfizierten HEK293-Zellen, die für die IL-8 ELISA Experimente verwendet wurden, wurde eine Durchflusszytometrie durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen geerntet, 2-mal in 10 ml PBS gewaschen und für 4 min bei 1200 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 1,3 ml PBS aufgenommen. Daraufhin wurden nach Zellzählung mindestens 1×10^6 Zellen pro Well in einem Volumen von 200 μ l auf eine 96-Well-Platte (*U-Bottom*)

überführt. Es erfolgte abermals die Abzentrifugation zur Zellpelletierung, woraufhin der PBS-Überstand abgesaugt werden konnte und die Zellen mit 50 µl der rezeptorspezifischen Antikörpern bzw. den entsprechenden Isotypkontrollen inkubiert wurden (4 °C, 45 min). Die jeweilige verwendete rezeptorspezifische Fluoreszenz-konjugierten (PE-/FITC) Antikörper und die entsprechenden Isotypkontrollen wurden hierfür in einer 1:50 Verdünnung angesetzt. Danach wurden die restlichen ungebundenen Antikörper abgesaugt, die Zellen dreimal mit 200 µl PBS gewaschen, erneut bei 1200 rpm für 4 min abzentrifugiert und mit 100 µl Paraformaldehyd (PFA) zur Fixierung über Nacht bei 4 °C gelagert. Am nächsten Tag erfolgte die Detektion der zellgebundenen Antikörper mittels fluoreszenzbasierter Durchflusszytometrie (*fluorescence-activated cell sorting, FACS*), durchgeführt durch Herrn Johannes Nelke. Hierfür erfolgte das Überführen der Zellen in Probenröhrchen, die Detektion der zellgebundenen Antikörper über ein FACSCalibur (BD Biosciences, Heidelberg (GER)).

3.3.5 Anti-FLAG-Affinitätschromatographie

Die Aufreinigung der jeweiligen Antikörper-Fusionsprotein-Überstände erfolgte mittels Anti-Flag-M2-Affinitätschromatographie. Hierfür wurden zuerst Anti-Flag-M2-Beads in eine Chromatographiesäule überführt und mit TBS gewaschen, 13 ml 0,1 M Glycin (pH 2,5) beigefügt und erneut 2 Mal mit TBS gewaschen. Den aufzureinigenden Überständen wurde 0,15 M NaCl beigefügt (1 g auf 100 ml) und diese wurden anschließend auf die Säule gegeben. Bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 Tropfen/25 s, lief der Überstand über Nacht im Kühlraum bei 4 °C durch die Chromatographiesäule. Am darauffolgenden Tag, nachdem der Überstand komplett durchgelaufen war, wurde die Chromatographiesäule mit 5 ml TBS zwei Mal gewaschen. Der Durchfluss wurde für die Detektion von möglich verbliebenem Protein gesammelt. Für die Elution der an die Anti-Flag-M2-Beads gebundenen Antikörper wurden 100 µg/ml FLAG-Peptid (3 faches Säulenvolumen) in TBS auf die Chromatographiesäule gegeben, sodass die Proteine von den Agarosebeads gelöst werden konnten. Bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 Tropfen/30 s

wurden die Eluate der einzelnen Antikörper-Fusionsproteine in ca. 800 µl umfassende einzelne Fraktionen in autoklavierten 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen aufgefangen. Nach der Elution wurden die Agarosebeads zweimal mit TBS gewaschen und die Beads bei 4 °C in einer Glycerin/TBS-Lösung (50 % Glycerin in TBS, 0,02 % Natriumazid) aufbewahrt. Zur genauen Proteinmengenbestimmung wurden die Eluate mittels SDS-PAGE und Silbergefärbung detektiert.

3.3.6 Silbergefärbung

Zur genauen Konzentrationsbestimmung der steril gefilterten Eluate nach Anti-Flag-M2 Affinitätschromatographie wurde eine Silbergefärbung durchgeführt. Hierfür wurde initial ebenfalls ein SDS-Page (s. 3.3.1.1) gegossen, jedoch ohne Bromphenolblau. Es erfolgte die Beladung der einzelnen Taschen mit den jeweiligen Eluaten sowie mit einem Silbergelmarker für die Proteinkonzentrationen und mit einem Proteinmarker für das Molekulargewicht. Nach erfolgter elektrophoretischer Auftrennung, wie unter 3.3.1.1 beschrieben, wurde das Gel mit den Reagenzien des Silver Stain Kits (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)) weiter behandelt. Zunächst erfolgte ein 2-maliges Waschen mit autoklaviertem dH₂O für 5 min. Daraufhin wurde das Gel mit einer Fixierlösung (dH₂O, 30 % Ethanol, 10 % Essigsäure) für 15 min inkubiert. Nach erneutem 2-maligem Waschen mit destilliertem, autoklaviertem Wasser für 5 min, erfolgte die Benetzung mit *Sensitizer Working Solution* (25 ml dH₂O, 50 µl *Sensitizer*). Daraufhin wurde das Gel 2 Mal mit autoklaviertem dH₂O für 5 min gewaschen und für 30 min mit der *Stain Working Solution* (25 ml *Stain Developer*, 500 µl *Enhancer*) inkubiert. Nach abermaligem 2-maligem Waschvorgang für 20 s erfolgte die abschließende Entwicklung des Gels mittels *Developer Working Solution* (25 ml *Stain Developer*, 500 µl *Enhancer*). Hierbei erfolgte die Inkubation so lang bis entsprechende Banden auf dem Gel sichtbar wurden, die durch die *Developer Working Solution* angefärbt wurden. Der Stopp der Reaktion erfolgte mittels 5 %iger Essigsäure.

4 Ergebnisse

4.1 Klonierung der Expressionsplasmide

Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit erfolgte zunächst die Klonierung der DNA-Sequenzen, die für die jeweiligen HCs und LCs der anti-CD40(C)-IgG1(N297A)-Antikörper-Fusionsprotein-Varianten codieren:

- 1.) anti-CD40(C)-F-VL-scFv:anti-CD70(2H5)-pCR3
- 2.) anti-CD40(C)-F-VH-N297A-scFv:anti-CD70(2H5)-pCR3

- 3.) anti-CD40(C)-F-VL-scFv:anti-BCMA(C11D53)-pCR3
- 4.) anti-CD40(C)-F-VH-N297A-scFv:anti-BCMA(C11D53)-pCR3

- 5.) anti-CD40(C)-F-VL-scFv:anti-PDL1(Avelumab)-pCR3

Sowohl die Plasmide, die für die HC und LC der anti-CD40(C)-IgG1(N297A)-Mutante, als auch für die LC mit C-terminaler GpL-Domäne und HC mit C-terminaler scFv:PDL1-Domäne der anti-CD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:PDL1, kodieren, waren in der Arbeitsgruppe für Molekulare Innere Medizin von Prof. Dr. Wajant bereits vorhanden. In Tabelle 2 sind die in dieser Arbeit klonierten Plasmide mit ihren entsprechenden Vektoren, Inserts und den verwendeten Schnittstellen für Restriktionsenzyme zusammengefasst. Nach erfolgter Klonierung erfolgte der Ausschluss einer möglichen Mutation der jeweiligen Plasmid-DNA mittels Sequenzierung und die PEI-Transfektion der Plasmid-DNA in HEK293-Zellen zur Produktion der Antikörper-Fusionsproteine.

Tabelle 2: Vektoren, Templates, Primer und Restriktionsenzyme, die zur Klonierung der schweren und leichten Ketten der verschiedenen Antikörper-Fusionsproteine verwendet wurden.

Plasmidname	Vektor	Vektorverdau	Insertverdau	PCR-Template-Insert	Primer
anti-CD40(C)-Flag-VL-scFv:anti-CD70(2H5)-pCR3	anti-CD40(C)-Flag-VL-GpL-pCR3	Xho1 + Xba1 + CIAP	Xho1 + Xba1	C4-HC-scFv:anti-CD70(2H5)-pCR3	anti-CD70(9G2)-VH-Xho1-fwd sp6-rwd
anti-CD40(C)-Flag-VH(N297A)-scFv:anti-CD70(2H5)-pCR3	anti-CD40(C)-Flag-VH-N297A-scFv:anti-BAFF-pCR3	Xho1 + Xba1 + CIAP	Xho1 + Xba1	C4-HC-scFv:anti-CD70(2h5)-pCR3	anti-CD70(9G2)-VH-Xho1-fwd sp6-rwd
anti-CD40(C)-Flag-VL-scFv:anti-BCMA(C11D53)-pCR3	anti-CD40(C)-Flag-VL-GpL(w/o)-pCR3	Xho1 + Xba1 + CIAP	Xho1 + Xba1	BCMA-CAR-pTN0056 (C11D53 VL-VH)	anti-BCMA-C11D53-Xho1-fwd anti-BCMA-C11D53-Stop-Xba-rwd
anti-CD40(C)-Flag-VH(N297A)-scFv:anti-BCMA(C11D53)-pCR3	anti-CD40(C)-Flag-VH-N297A-scFv:anti-BAFF-pCR3	Xho1 + Xba1 + CIAP	Xho1 + Xba1	BCMA-CAR-pTN0056 (C11D53 VL-VH)	anti-BCMA-C11D53-Xho1-fwd anti-BCMA-C11D53-Stop-Xba-rwd
anti-CD40(C)-Flag-VL-scFv:anti-PDL1(Avelumab)-pCR3	anti-CD40(C)-Flag-VL-GpL-pCR3	Xho1 + Xba1 + CIAP	Xho1 + Xba1	anti-PD-L1 (Avelumab)-pMA-RQ	anti-PDL1-Xho1-fwd anti-PDL1-Stop-Xba1-rwd

4.2 Produktion der Antikörper-Fusionsproteine

Nach Kontrolle der erfolgreichen Klonierung über die Sequenzbestimmung erfolgte die Produktion der jeweiligen Antikörper-Fusionsproteine. Die schematische Darstellung ist in Abbildung 3 aufgezeigt.

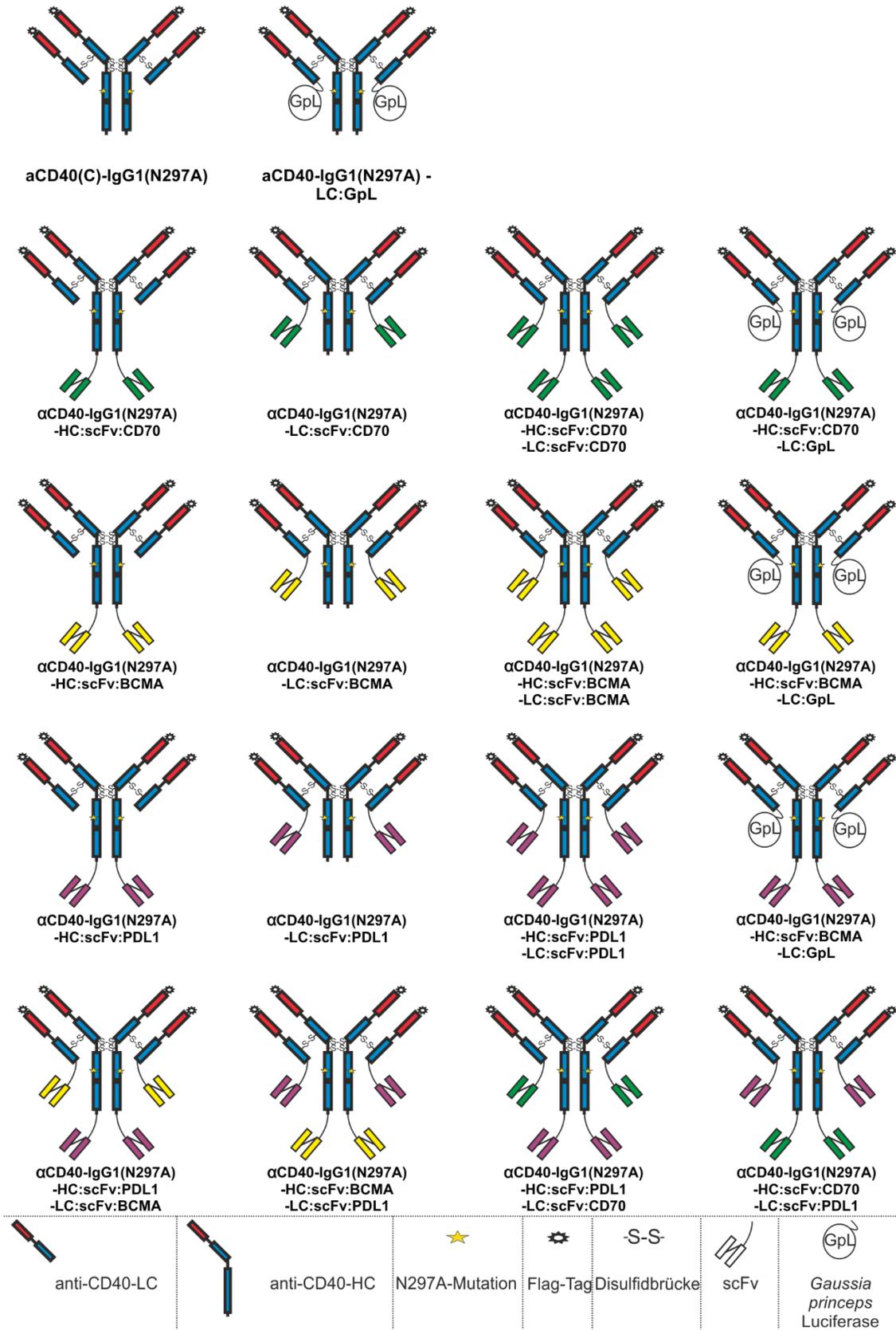


Abbildung 3: Schematische Darstellung der produzierten Antikörper-Fusionsproteine

Für die Produktion wurden die HCs und LCs in HEK293-Zellen mittels PEI transfiziert. Nach 7-tägiger Produktion wurden die Überstände der transfizierten HEK293-Zellen abgenommen und die Antikörper-Fusionsproteine nach Auftrennung über einen SDS-Page mittels Western-Blot detektiert (Abb. 4).

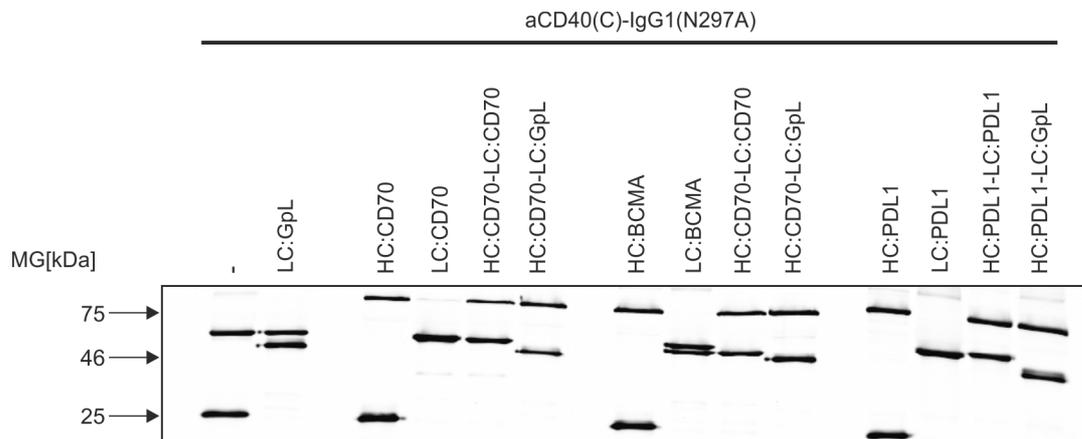


Abbildung 4: Western Blot Analyse der produzierten Antikörper-Fusionsproteine:

15 μ l des jeweiligen Überstandes der HEK293-Transfektanten wurde zur Konzentrationsbestimmung auf ein SDS-Gel aufgetragen. Nach erfolgter Konzentrationsbestimmung mittels anti-Flag Western Blot und Flag-Proteinstandard, wurden 100 ng der jeweiligen Antikörperfusionsproteine aufgetragen. Die Antikörper-Fusionsproteine mit unterschiedlichen scFv-Verankerungsdomänen sind aufgrund der Übersichtlichkeit in Abbildung 7 in sog. Panels aufgeführt, wobei die gleichen Überstände aufgetragen wurden.
kDa: Kilodalton, MG:Molekulargewicht

Die HCs parentaler Antikörper wiegen, wie unter 1.4.1 beschrieben, etwa 55 kDa, die LCs ca. 25 kDa. Gentechnisch modifizierte LCs mit C-terminaler Verknüpfung von *Gaussia princeps* Luziferase (GpL), weisen ein Molekulargewicht von ca. 48 kDa auf. Aus Abbildung 4 lässt sich Folgendes für die produzierten Antikörper-Fusionsproteine ableiten: Die HCs und LCs der anti-CD40(C)-IgG1(N297A)-Mutante ohne scFv-Verankerungsdomäne weisen das gleiche Molekulargewicht wie parentale Antikörper auf. Die HCs mit ihren jeweiligen scFv-Verankerungsdomänen weisen ein höheres Molekulargewicht von ca. 80 kDa auf, ebenso die LCs mit ihren jeweiligen scFv-Domänen von ca. 50 kDa. Die jeweiligen GpL-Varianten weisen ein Molekulargewicht von ca. 48 kDa auf und entsprechen somit dem erwarteten Molekulargewicht.

Die Proteinkonzentrations-Bestimmung der jeweiligen Antikörper-Fusionsproteine erfolgte mittels LI-COR Odyssey Systems über eine Standardgerade eines definierten Proteinstandards mit Flag-Tag. In Tabelle 3 sind die jeweiligen Konzentrationen der Antikörper-Fusionsproteine in µg/ml zusammengefasst.

Tabelle 3: Tabellarische Auflistung der Konzentrationen der einmaligen Testproduktion der Antikörper-Fusionsproteine.

Antikörper	Konzentration [µg/ml]
αCD40(C)-IgG1(N297A)	39
αCD40(C)-IgG1(N297A)-LC:GpL	35
αCD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:CD70	36
αCD40(C)-IgG1(N297A)-LC:scFv:CD70	22
αCD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:CD70-LC:scFv:CD70	15
αCD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:CD70-LC:GpL	52
αCD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:BCMA	19
αCD40(C)-IgG1(N297A)-LC:scFv:BCMA	20
αCD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:BCMA-LC:scFv:BCMA	19
αCD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:BCMA-LC:GpL	36
αCD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:PDL1	48
αCD40(C)-IgG1(N297A)-LC:scFv:PDL1	12
αCD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:PDL1-LC:scFv:PDL1	25
αCD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:PDL1-LC:GpL	38
αCD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:CD70-LC:scFv:PDL1	16
αCD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:PDL1-LC:scFv:CD70	6
αCD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:BCMA-LC:scFv:PDL1	26
αCD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:PDL1-LC:scFv:BCMA	10

Die Produktivität aller Antikörper-Fusionsproteine war mit 6 - 48 und typischerweise > 10 µg/ml sehr gut (s. Tab.3).

4.3 Funktionelle Prüfung der produzierten Antikörper-Fusionsproteine

4.3.1 Affinitätsbestimmung der jeweiligen GpL-Varianten der Antikörper-Fusionsproteine

Nach erfolgter Produktion der Antikörper-Fusionsproteine erfolgte zunächst die Evaluation der Bindungsfähigkeit der CD40-Domäne wie auch der jeweiligen scFv-Verankerungsdomänen. Der CD40-spezifische Antikörper ohne Verankerungsdomäne sowie die Antikörper-Fusionsproteine mit scFv-Verankerungsdomäne an der HC wurden als Variante mit einer GpL-Domäne C-terminal an der LC produziert. Die Berechnung der spezifischen Bindungsfähigkeit der einzelnen Domänen erfolgte über die Subtraktion der unspezifischen Bindung von der totalen Bindung. Mittels GraphPad Prism 5 konnte der K_D -Wert in ng/ml sowie R^2 bestimmt werden, wobei nur Bindungsstudien mit $R^2 > 0,96$ mit einbezogen wurden.

Die Quantifizierung der Bindungsaffinität der anti-CD40-Domäne der einzelnen Antikörper-Fusionsprotein-GpL-Varianten erfolgte mit HT1080-CD40-Zellen für die totale Bindung und HT1080-Zellen für die unspezifische Bindung. Die Experimente wurden mindestens drei Mal durchgeführt. In Abbildung 5 ist eine exemplarische Bindungskurve für jedes Antikörper-GpL-Fusionsprotein aufgezeigt.

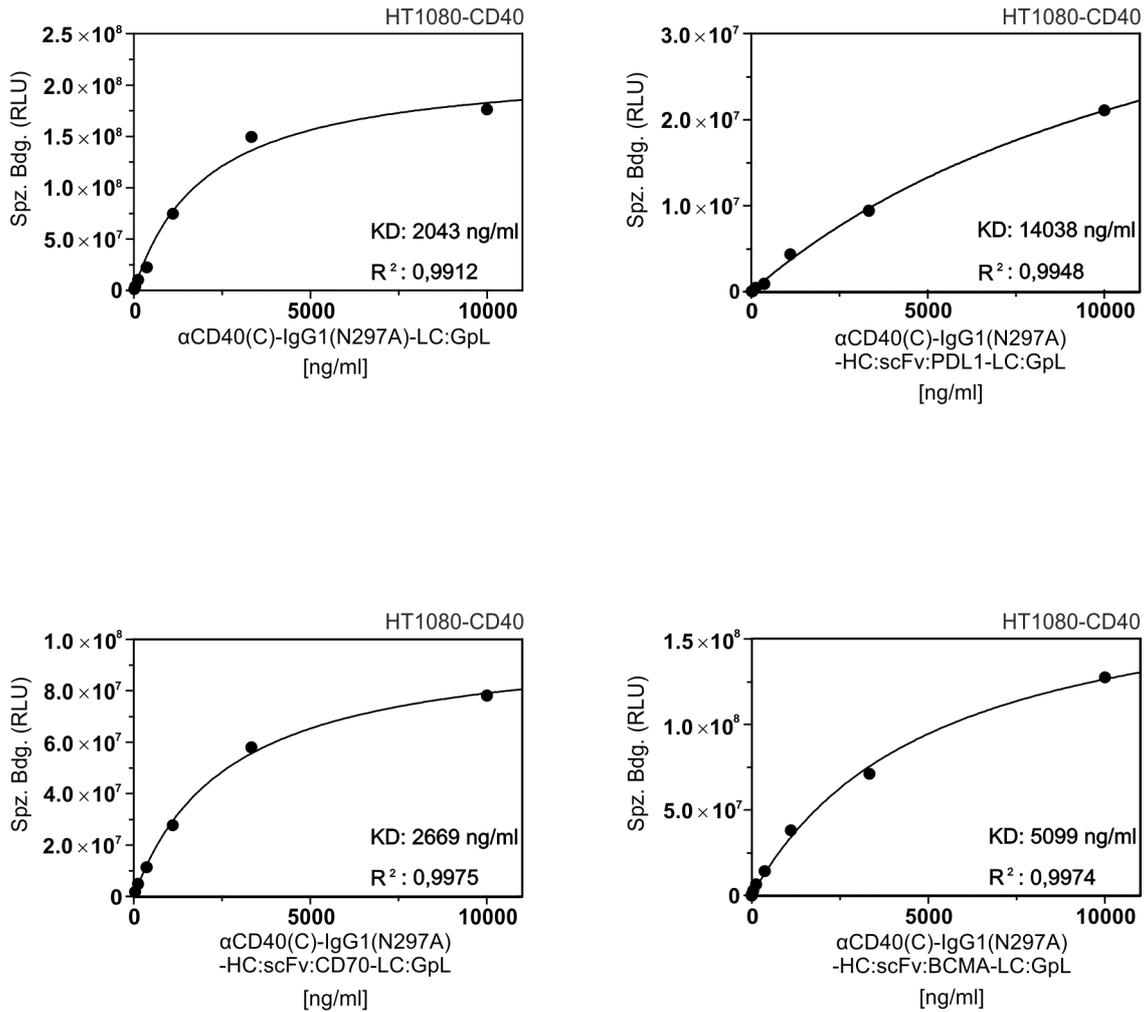


Abbildung 5: Gleichgewichtsbindungsstudien der GpL-Varianten der CD40-spezifischen Antikörper-Fusionsprotein mit HT1080-CD40-Zellen.

Die Durchführung der Gleichgewichtsbindungsstudien der GpL-Variante des Antikörpers ohne Verankerungsdomäne, sowie die jeweiligen Antikörper-Fusionsproteine mit scFv-Verankerungsdomäne, erfolgte zur Quantifizierung der Bindungsaffinität der CD40-Domäne. Hierfür wurden am Vortag 2×10^5 HT1080-Zellen pro Well sowie 2×10^5 HT1080-CD40-Zellen pro Well in 24-Well-Platten ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Inkubation der Zellen mit den Antikörper-Fusionsprotein-GpL-Varianten in steigenden Konzentrationen. Dabei erfolgte die Ermittlung der spezifischen Bindung über die Differenz der totalen Bindung an HT1080-CD40-Zellen mit der unspezifischen Bindung an HT1080-Zellen.

K_D : Dissoziationskonstante, RLU: relative light units (relative Lichteinheiten), R^2 : Determinationskoeffizient, Spz. Bdg.: Spezifische Bindung

Die einzelnen K_D -Werte, sowie Mittelwerte der K_D s und Standardabweichungen (SD) der jeweiligen anti-CD40 Antikörper-Fusionsproteine sind in Tabelle 4 aufgezeigt. Alle Antikörper-Fusionsprotein-GpL-Varianten zeigten eine hoch-affine Bindung an ihr Antigen CD40.

Die mittlere K_D der α CD40(C)-IgG1(N297A)-LC:GpL Variante ohne Verankerungsdomäne betrug 2,1 μ g/ml. Vergleichbar dazu sind die jeweiligen K_D s von α CD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:CD70-LC:GpL und α CD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:BCMA-LC:GpL, von 2,8 μ g/ml und 3,9 μ g/ml, wobei die Abweichung durch Pipettierungenauigkeiten bzw. Fehler in der Konzentrationsbestimmung erklärt werden kann. Auffallend ist jedoch die sehr viel höhere K_D und damit niedrigere Bindungsaffinität von α CD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:PDL1-LC:GpL um den Faktor von 9.

Tabelle 4: Übersicht einzelner K_D -Werte der α CD40(C)-IgG1(N297A)-Fusionsproteine der CD40-Domäne

Es erfolgte die Mittelwert-Bildung der jeweiligen K_D s der Bindungsstudien und die Bestimmung SD.

^a: zwei K_D -Werte der Bindungsstudien des Antikörper-Fusionsproteins α CD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:PDL1-LC:GpL wurden aufgrund des linearen Verlaufs der Graphen nicht für die Mittelwert-Bestimmung einbezogen

K_D : Dissoziationskonstante, SD: Standardabweichung

Antikörper	Anzahl der Wiederholungen	Einzelne K_D Werte [μ g/ml]	Mittlerer K_D Wert [μ g/ml] \pm SD
α CD40(C)-IgG1(N297A)-LC:GpL	5	2,6 / 2,0 / 4,5 / 0,5 / 0,8	2,1 \pm 0,3
α CD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:PDL1-LC:GpL	5	14,0 / 14,6 / 29,4 ^a	19,3 \pm 6
α CD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:CD70-LC:GpL	4	2,9 / 1,7 / 2,7 / 4,0	2,8 \pm 0,4
α CD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:BCMA-LC:GpL	3	2,4 / 5,1 / 4,3	3,9 \pm 0,3

Um zu prüfen, ob die scFv-Verankerungsdomänen die erwartete Bindungsfähigkeit für die jeweiligen Oberflächenantigene PDL1, CD70 und BCMA besitzen, wurden gleichfalls Gleichgewichtsbindungsstudien durchgeführt. Dabei wurden HEK293-Zellen mit einem Leervektor (EV, *empty vector*) für die Ermittlung der unspezifischen Bindung und mit entsprechenden Vektoren, welche die jeweiligen Oberflächenantigene PDL1, CD70 und BCMA kodieren, für die Ermittlung der totalen Bindung transfiziert, um die jeweiligen Bindungsaffinitäten zu quantifizieren.

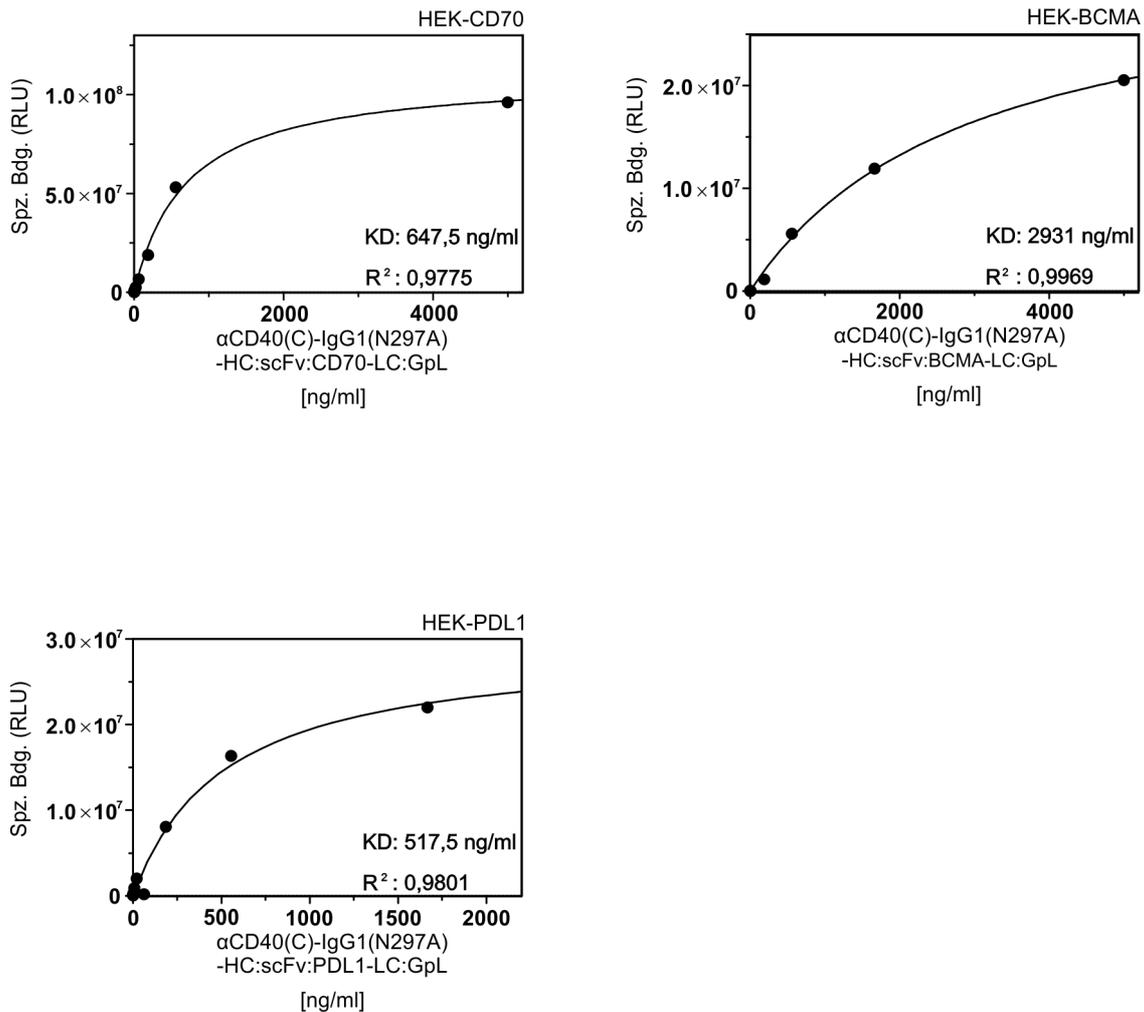


Abbildung 6: Gleichgewichtsbindungsstudien der GpL-Varianten der CD40-spezifischen Antikörper-Fusionsproteine mit transfizierten HEK293-Zellen.

Die Durchführung der Gleichgewichtsbindungsstudien der GpL-Varianten der jeweiligen Antikörper-Fusionsproteine mit scFv-Verankerungsdomäne erfolgte zur Quantifizierung der Bindungsaffinität der jeweiligen scFv-Domänen: CD70, BCMA, PDL1. Hierfür wurden 6×10^5 HEK-293-Transfektanten (HEK-CD70, HEK-BCMA, HEK-PDL1) und HEK-293-Transfektanten (EV) als negative Kontrolle pro Eppendorf Gefäß ausgesät und mit den jeweiligen Antikörper-Fusionsprotein-GpL-Varianten in steigenden Konzentrationen inkubiert. Dabei erfolgte die Ermittlung der spezifischen Bindung über die Differenz der totalen Bindung an HEK293-Zellen, die mit den jeweiligen Oberflächenantigenen transfiziert wurden (CD70, BCMA, PDL1), mit der unspezifischen Bindung an Leervektor transfizierte HEK293-Zellen.

K_D: Dissoziationskonstante, RLU: relative light units (relative Lichteinheiten), R²: Determinationskoeffizient, Spz. Bdg.: spezifische Bindung

In Abbildung 6 sind beispielhaft einzelne Bindungskurven der anti-CD40 Antikörper-Fusionsproteine mit unterschiedlichen scFv-Verankerungsdomänen für die jeweiligen Verankerungs-Targets dargestellt, wobei die Experimente zumindest dreimalig wiederholt wurden.

Die einzelnen K_D -Werte, sowie Mittelwerte der K_D s und SDs sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: Übersicht der K_D -Werte der jeweiligen scFv-Verankerungsdomäne der α CD40(C)-IgG1(N297A)-Fusionsproteine für ihr Verankerungs-Target

^a: ein K_D -Wert der Bindungsstudie des Antikörper-Fusionsproteins α CD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:PDL1-LC:GpL wurde aufgrund des niedrigen R^2 von 0,92 nicht für die Mittelwert-Bestimmung einbezogen.

^b: ein K_D -Wert der Bindungsstudie des Antikörper-Fusionsproteins α CD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:CD70-LC:GpL wurde aufgrund des linearen Verlaufs des Graphen nicht für die Mittelwert-Bestimmung einbezogen

K_D : Dissoziationskonstante, SD: Standardabweichung

Antikörper	Anzahl der Wiederholungen	Einzelne K_D -Werte [μ g/ml]	Mittlerer K_D -Wert [μ g/ml] \pm SD
CD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:PDL1-LC:GpL	4	0,5/ 0,9/ 0,9 ^a	0,8 \pm 0,1
α CD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:CD70-LC:GpL	4	1,2/ 1,0/ 0,6 ^b	1,1 \pm 0,1
α CD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:BCMA-LC:GpL	3	3,2/ 5,6/ 2,9	4,0 \pm 0,9

Die einzelnen scFv-Domänen zeigten eine hohe spezifische Bindungsfähigkeit, wobei die CD70-bindende, ebenso wie die PDL1-bindende scFv-Domäne mit K_D -Werten von 0,8 bzw. 1,1 μ g/ml sehr nahe beieinander lagen. Eine etwas höhere K_D von ca. 4 μ g/ml wies die scFv:BCMA-Domäne auf.

4.3.2 Prüfung der CD40-stimulierenden Aktivität der Antikörper-Fusionsproteine mittels IL-8 ELISA

Die agonistische Aktivitätsprüfung der CD40-spezifischen Antikörper-Fusionsproteine erfolgte über die Analyse der $NF\kappa B$ -vermittelten IL-8 Sekretion in HT1080-CD40-Zellen. Die IL-8 Sekretion wurde dabei mittels IL-8 ELISA quantifiziert.

Für die Aktivitätsprüfung wurden HT1080-CD40-Zellen mit den in Abbildung 7 aufgezeigten Antikörper-Fusionsproteinen sowie HEK293-Transfektanten, die mit einem Leervektor (EV) oder einem Expressionsplasmid für CD70, PDL1 oder BCMA transfiziert wurden, stimuliert.

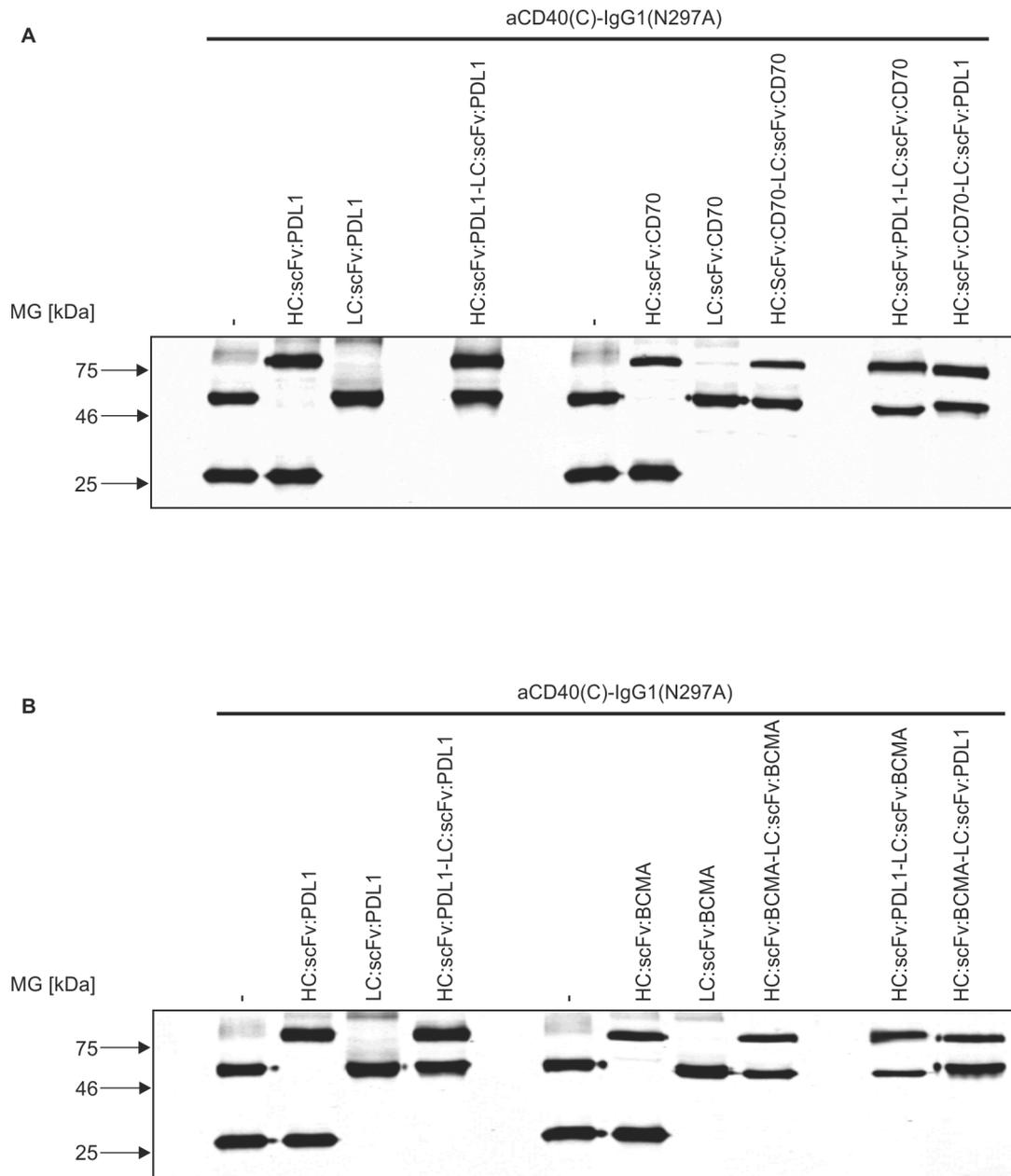


Abbildung 7: Übersicht der einzelnen Antikörper-Fusionsprotein-Panels

15 μ l des jeweiligen produzierten Überstandes der HEK293-Transfektanten aus 4.2 wurde zur Konzentrationsbestimmung auf ein SDS-Gel aufgetragen. Dabei handelt es sich um die gleichen Überstände aus Abbildung 4, ausgenommen der Überstände mit den Antikörper-Fusionsproteinen mit unterschiedlichen Verankerungsdomänen. Nach erfolgter Konzentrationsbestimmung mittels anti-Flag Western Blot und Flag-Proteinstandard, wurden 100 ng der jeweiligen Antikörper-Fusionsproteine zur besseren Übersicht der für die agonistischen Aktivitätsprüfung mittels IL-8 ELISA genutzten Antikörper-Fusionsproteine erneut auf ein Gel aufgetragen. Die Abbildung zeigt 100 ng der einzelnen Antikörper-Fusionsproteine deren agonistische Aktivität mittels IL-8 ELISA geprüft wurde.

A: Panel der Antikörper-Fusionsproteine mit PDL1 und CD70 scFv-Verankerungsdomäne sowie die Kombination beider unterschiedlicher scFv-Verankerungsdomänen miteinander und der Antikörper ohne Verankerungsdomäne

B: Panel der Antikörper-Fusionsproteine mit PDL1 und BCMA scFv-Verankerungsdomäne sowie die Kombination beider unterschiedlicher scFv-Verankerungsdomänen miteinander und der Antikörper ohne Verankerungsdomäne.
kDa: Kilodalton, MG: Molekulargewicht

Die Transfektion der für den IL-8 ELISA genutzten HEK293-Transfektanten wurde mittels Durchflusszytometrie (FACS) überprüft (Abb. 8).

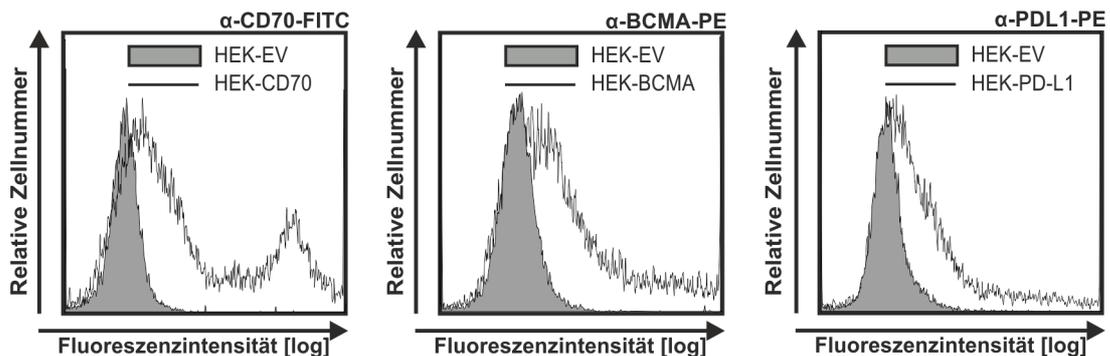


Abbildung 8: Transfektionseffizienz der für den IL-8 ELISA verwendete HEK293-Transfektanten

Überprüfung der erfolgreichen Transfektion der HEK293-Zellen, Es wurden ein FITC gelabelter anti-CD70-, ein PE gelabelter anti-BCMA- und ein PE gelabelter anti-PDL1-Antikörper verwendet.

In Abbildung 8 zeigte sich ein klarer Fluoreszenz-Intensitäts-Shift der einzelnen HEK293-Transfektanten gegenüber den mit einem Leervektor (EV) transfizierten HEK293-Zellen. Dabei betrug die Transfektionseffizienz von PDL1 ca. 39%, die von BCMA ca. 62 % und die von CD70 ca. 50%, was einer guten Transfektionsrate entsprach. Die Bindung der einzelnen Antikörper-Fusionsproteine über deren scFv-Domäne war somit an einem großen Teil der transfizierten Zellen gewährleistet.

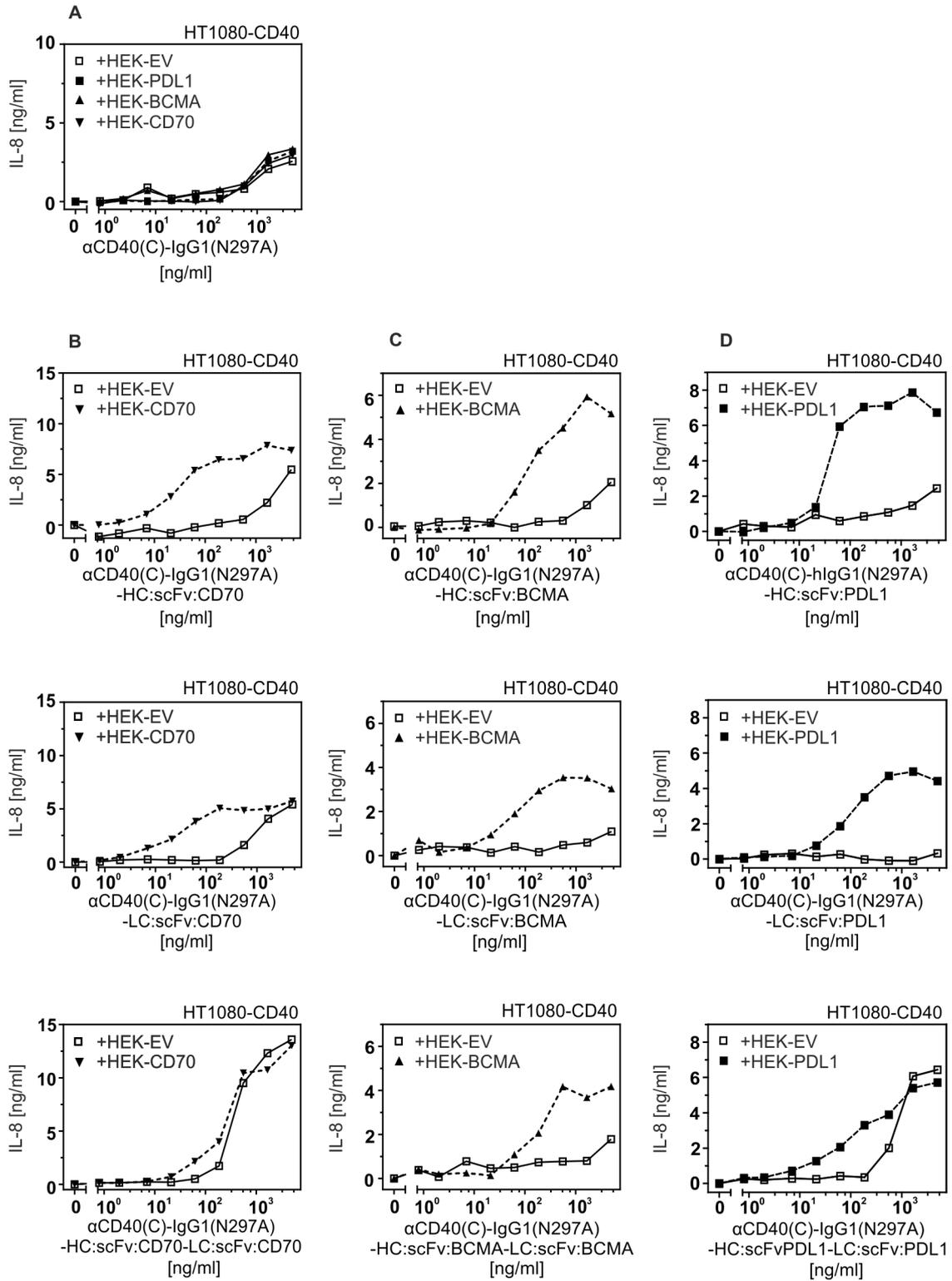


Abbildung 9: IL-8 ELISA zur agonistischen Aktivitätsprüfung der anti-CD40-spezifischen Antikörper-Fusionsproteine in Ko-Kulturen aus HT1080-CD40-Zellen und HEK293-Transfektanten.

2 x 10⁴ HT1080-CD40-Zellen pro Well wurden am Vortag in eine 96-Well-Platte ausgesät. Es erfolgte die Inkubation mit den jeweiligen Antikörper-Fusionsproteinen in ihren jeweilig angegebenen Konzentrationen und mit den jeweiligen HEK293-Transfektanten mit einer Zellzahl von 4 x 10⁴ pro Well. Die HEK293-Zellen wurden zuvor mittels PEI-Transfektionen mit einem Leervektor (EV) oder mit einem Expressionsvektor, der das entsprechende Zielantigen (CD70, BCMA, PDL1) für die jeweilige scFv-Verankerungsdomäne der Antikörper-Fusionsproteine exprimiert, transfiziert. Es erfolgte ebenfalls die Inkubation der HT1080-CD40-Zellen und den jeweiligen HEK293-Zellen mit dem Antikörper ohne scFv-Verankerungsdomäne, um die direkte Abhängigkeit der Rezeptoraktivierung durch die scFv-bedingte Immobilisation aufzeigen zu können. Nach 24 h Inkubation erfolgte die IL-8 Konzentrationsbestimmung im Überstand mittels IL-8 ELISA.

Der Antikörper ohne scFv-Verankerungsdomäne (A) wurde verglichen mit den Antikörper-Fusionsproteinen mit scFv:CD70-Verankerungsdomäne (B) am C-Terminus der HC (oben), der LC (mitte) oder HC und LC (unten), sowie den entsprechenden Varianten der Antikörper-Fusionsproteinen mit scFv:BCMA-Verankerungsdomäne (C) und scFv:PDL1-Verankerungsdomäne(D).

IL-8: Interleukin 8

In Abbildung 9(A) zeigte sich keine nennenswerte Induktion der IL-8 Produktion der HT1080-CD40-Zellen nach Inkubation mit α CD40(C)-IgG1(N297A), unabhängig davon, welche HEK293-Transfektanten kokultiviert wurden. Ab einem Konzentrationswert-Schwellenwert des Antikörpers von ca. 280 ng/ml kam es in allen Fällen zu einer nur moderaten IL-8 Induktion.

Im Gegensatz dazu standen die Antikörper-Fusionsproteine mit scFv-Verankerungsdomänen, die mit einer Ausnahme (α CD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:CD70-LC:scFv:CD70) immer dann eine deutlich verstärkte IL8-Induktion zeigten, wenn sie mit HEK293-Transfektanten kokultiviert wurden, die das entsprechende Verankerungs-Target exprimierten. So konnte bereits bei niedrigeren Konzentrationen der Antikörper-Fusionsproteine eine gesteigerte Aktivierung des Rezeptors CD40 erzielt werden, wenn CD70-, BCMA- bzw. PDL1-positive HEK293-Zellen vorhanden waren. Dagegen wurde bei entsprechenden HEK293-EV Negativkontrollzellen mit sämtlichen Varianten lediglich eine minimale CD40-Aktivierung erzielt, die vergleichbar mit der Aktivität der N297A-Mutante ohne scFv-Verankerungsdomäne war.

Dabei zeigte sich schon ab einer Konzentration von ca. 15-27 ng/ml eine IL-8 Induktion durch die Antikörper-Fusionsproteine mit der scFv-Verankerungsdomäne an der HC (s. Abb. 9 (B), (C), (D), oben) bzw. 10-20 ng/ml durch Antikörper-Fusionsproteine mit der scFv-Verankerungsdomäne an der LC (s. Abb. 9(A), (C), (D), Mitte). Die

Antikörper-Fusionsproteine α CD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:CD70, α CD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:BCMA und α CD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:PDL1 führten zu einer maximalen IL-8 Induktion von ca. 6,8-7,6 ng/ml (s. Abb. 9(B), (C), (D), oben). Eine etwas geringere maximale IL-8 Induktion von ca. 3,4-5,2 ng/ml wurde durch die Antikörper-Fusionsproteine mit der scFv-Verankerungsdomäne an der LC erreicht: α CD40(C)-IgG1(N297A)-LC:scFv:CD70, α CD40(C)-IgG1(N297A)-LC:scFv:BCMA und α CD40(C)-IgG1(N297A)-LC:scFv:PDL1 (s. Abb. 9(B), (C), (D), Mitte).

Die Antikörper-Fusionsproteine mit scFv-Verankerungsdomänen sowohl an der HC als auch an der LC (α CD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:CD70-LC:scFv:CD70, und α CD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:PDL1-LC:scFv:PDL1) (s. Abb. 9(B), (D), unten), führten bei HEK293-EV Negativkontrollzellen, also unabhängig von einer Immobilisation, bereits zu einer gesteigerten IL-8 Induktion, was durch eine Aggregation der Antikörper-Fusionsproteine im Überstand zu erklären sein könnte. Eine Ausnahme bildete dabei das Antikörper-Fusionsprotein α CD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:BCMA-LC:scFv:BCMA (s. Abb. 9(C), unten), welches ebenfalls eine gesteigerte IL-8 Induktion bei Zugabe des Antikörper-Fusionsproteins in niedrigeren Konzentrationen mit BCMA-positiven HEK293-Zellen induzierte, im Vergleich zu HEK293-EV Negativkontrollzellen, die das entsprechende Oberflächenantigen nicht exprimierten.

Dabei zeigte sich ab einer Konzentration von ca. 20-65 ng/ml der Antikörper-Fusionsproteine mit scFv-Verankerungsdomänen an HC und LC eine IL-8 Induktion (s. Abb. 9(B), (C), (D), unten). Die maximale IL-8 Induktion der Antikörper-Fusionsproteine α CD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:PDL1-LC:scFv:PDL1 und α CD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:BCMA-LC:scFv:BCMA betrug ca. 4,0-5,2 ng/ml, und befand sich somit im ähnlichen Bereich wie die der Antikörper-Fusionsproteine mit scFv-Verankerungsdomänen je an HC und LC. Stark abweichend davon war die maximale IL-8 Produktion von ca. 10,4 ng/ml durch α CD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:CD70-LC:scFv:CD70.

In Kokulturen mit HEK293-EV zeigten die Antikörper-Fusionsproteine typischerweise eine ähnlich schwache Aktivität wie α CD40(C)-IgG1(N297A).

α CD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:CD70-LC:scFv:CD70 als auch
 α CD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:PDL1-LC:scFv:PDL1 zeigten mit
HEK293-EV-Zellen eine deutlich gesteigerte IL-8 Induktion im Vergleich zur
 α CD40(C)-IgG1(N297A)-Mutante ohne scFv-Verankerungsdomäne, was durch
Aggregation der Konstrukte erklärbar wäre. Dies sollte in weiterführenden
Versuchen geklärt werden, war aber nicht Teil dieser Arbeit.

Tabelle 6: EC₅₀-Werte als Maßzahl der Aktivierung von CD40 durch CD40-spezifische Antikörper-Fusionsproteine

EC₅₀-Werte wurden aus Abbildung 9 erhoben.

^a: Maximalkonzentration der Antikörper-Fusionsproteine als Näherungswert, wenn aufgrund des Kurvenverlaufs der entsprechende EC₅₀-Wert bei Inkubation mit HEK293-EV nicht ableitbar war.

EC₅₀: mittlere effektive Konzentration

Antikörper	EC ₅₀ HEK-EV [ng/ml]	EC ₅₀ HEK-CD70 [ng/ml]	Quotient EC ₅₀ HEK-EV / EC ₅₀ HEK-CD70
αCD40(C)-IgG1(N297A)- HC:scFv:CD70	2777	29	95
αCD40(C)-IgG1(N297A)- LC:scFv:CD70	799	26	31
αCD40(C)-IgG1(N297A)- HC:scFv:CD70-LC:scFv:CD70	297	224	1
	EC ₅₀ HEK-EV [ng/ml]	EC ₅₀ HEK-BCMA [ng/ml]	Quotient EC ₅₀ HEK-EV / EC ₅₀ HEK-BCMA
αCD40(C)-IgG1(N297A)- HC:scFv:BCMA	5000 ^a	97	>52
αCD40(C)-IgG1(N297A)- LC:scFv:BCMA	5000 ^a	54	>92
αCD40(C)-IgG1(N297A)- HC:scFv:BCMA- LC:scFv:BCMA	5000 ^a	182	>27
	EC ₅₀ HEK-EV [ng/ml]	EC ₅₀ HEK-PDL1 [ng/ml]	Quotient EC ₅₀ HEK-EV / EC ₅₀ HEK-PDL1
αCD40(C)-IgG1(N297A)- HC:scFv:PDL1	5000 ^a	34	>147
αCD40(C)-IgG1(N297A)- LC:scFv:PDL1	5000 ^a	73	>68
αCD40(C)-IgG1(N297A)- HC:scFv:PDL1-LC:scFv:PDL1	701	110	6

In Tabelle 6 sind die gewonnenen EC₅₀-Werte der IL-8 ELISA der Abbildung 9 aufgezeigt.

Vergleicht man die einzelnen EC_{50} -Werte, der jeweiligen Antikörper-Fusionsproteine für die jeweiligen CD70-, BCMA- und PDL1- positiven HEK293-Zellen so zeigt sich, dass die EC_{50} -Werte von $\alpha CD40(C)$ -IgG1(N297A)-HC:scFv:CD70 mit 29 ng/ml und $\alpha CD40(C)$ -IgG1(N297A)-LC:scFv:CD70 mit 26 ng/ml nahezu identisch sind. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich bei den Antikörper-Fusionsproteinen mit der scFv:BCMA-Verankerungsdomäne an der HC mit 97 ng/ml und an der LC mit 54 ng/ml, sowie mit der scFv:PDL1-Verankerungsdomäne an der HC mit 34 ng/ml und an der LC mit 73 ng/ml. Die jeweiligen Werte waren zwar höher und lagen im direkten Vergleich weiter auseinander, jedoch war die Diskrepanz nicht so groß wie im direkten Vergleich zu den Antikörper-Fusionsproteinen mit scFv-Verankerungsdomänen sowohl an der HC und der LC. So zeigte sich für alle Antikörper-Fusionsproteine mit scFv-Verankerungsdomäne sowohl an der HC und LC weitaus höhere EC_{50} -Werte: 224 ng/ml für $\alpha CD40(C)$ -IgG1(N297A)-HC:scFv:CD70-LC:scFv:CD70, 182 ng/ml $\alpha CD40(C)$ -IgG1(N297A)-HC:scFv:BCMA-LC:scFv:BCMA und 110 ng/ml für $\alpha CD40(C)$ -IgG1(N297A)-HC:scFv:PDL1-LC:scFv:PDL1. Es scheint also eine höhere Konzentration notwendig zu sein, um eine halbmaximale IL-8 Sekretion durch Antikörper-Fusionsproteine mit scFv-Verankerungsdomänen sowohl an der HC und der LC zu induzieren. Vergleicht man die EC_{50} HEK-EV-Werte der einzelnen Antikörper-Fusionsproteine aus den Experimenten mit den HEK-EV-Kontrollzellen, so zeigt sich für $\alpha CD40(C)$ -IgG1(N297A)-LC:scFv:CD70 mit 799 ng/ml, $\alpha CD40(C)$ -IgG1(N297A)-HC:scFv:CD70-LC:scFv:CD70 mit 297 ng/ml und $\alpha CD40(C)$ -IgG1(N297A)-HC:scFv:PDL1-LC:scFv:PDL1 mit 701 ng/ml niedrigere EC_{50} HEK-EV-Werte im Vergleich zu den anderen Antikörper-Fusionsproteinen. Diese schienen also bereits bei niedrigeren Konzentrationen ohne scFv-vermittelte Immobilisation eine IL-8 Induktion zu bewirken. Ein Maß für den Agonismus der jeweiligen Antikörper-Fusionsproteine in Abhängigkeit zur Immobilisation stellt der EC_{50} -Quotient dar (s. Tab. 6, Spalte 4). Antikörper-Fusionsproteine mit Verankerungsdomänen an der HC und LC zeigten die niedrigsten Quotienten auf, somit war für deren Agonismus weniger entscheidend, ob eine

Immobilisation über die jeweilige scFv-Domäne gewährleistet wurde. Einzige Ausnahme stellte dabei das Antikörper-Fusionsprotein mit scFv:BCMA-Verankerungsdomäne an der HC und LC da (vgl. Tab. 6). Zwar war eine höhere Konzentration notwendig, um eine halbmaximale IL-8 Induktion in Anwesenheit von HEK293-BCMA Transfektanten zu bewirken, andererseits kam es ohne Immobilisation im Gegensatz zu α CD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:CD70-LC:scFv:CD70 und α CD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:PDL1-LC:scFv:PDL1 nicht bereits zu einer IL-8 Induktion (vgl. Tab 6, Spalte 2). Hier schien also die scFv-vermittelte Immobilisierung eine Relevanz zu haben.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass anti-CD40 Antikörper-Fusionsproteine mit einer scFv-Verankerungsdomäne nur an der LC oder HC einen starken Agonismus nach Bindung an ihr Verankerungs-Target zeigen und eine weiter gesteigerte Anzahl an scFv-Verankerungsdomänen keinen erhöhten Verankerungs-abhängigen CD40 Agonismus zur Folge hat.

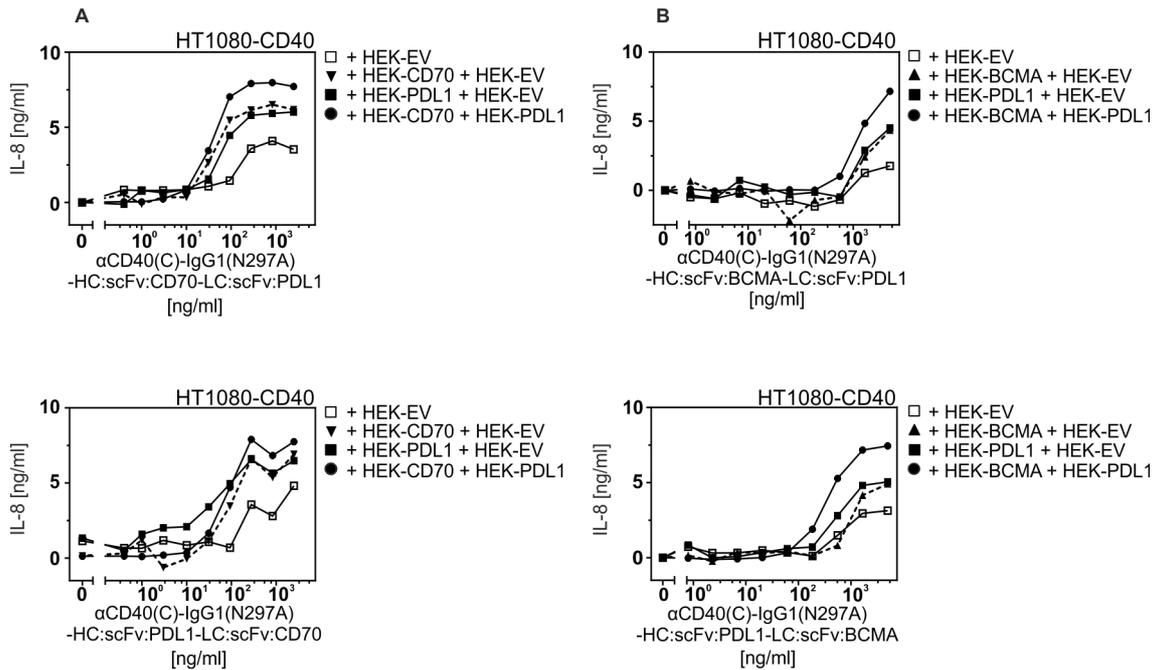


Abbildung 10: IL-8 ELISA zur agonistischen Aktivitätsprüfung der anti-CD40-spezifischen Antikörper-Fusionsproteine mit unterschiedlichen scFv-Verankerungsdomänen an HC und LC auf HT1080-CD40-Zellen und HEK293-Transfektanten als Ko-Kultur-Zellen.

2 x 10⁴ pro Well an HT1080-CD40-Zellen wurden am Vortag in eine 96-Well-Platte ausgesät. Es erfolgte die Zugabe der Antikörper-Fusionsproteine in ihren jeweilig angegebenen Konzentrationen und ihren jeweiligen HEK293-Transfektanten mit einer Zellzahl von 4 x 10⁴ pro Well. Wurden unterschiedliche Transfektanten gleichzeitig ausgesät, so wurden je 2 x 10⁴ HEK293-Transfektanten pro Well ausgesät, um eine Gesamtzahl von 4 x 10⁴ zu gewährleisten. Die HEK293-Zellen wurden zuvor mittels PEI-Transfektanten mit einem Leervektor (empty vector) oder mit einem Expressionsvektor, der für die jeweilige scFv-Verankerungsdomäne der Antikörper-Fusionsproteine das entsprechende Oberflächenantigen exprimiert (CD70, BCMA, PDL1), transfiziert. Nach 24 h Inkubationszeit erfolgte die IL-8 Konzentrationsbestimmung im Überstand mittels ELISA.

Es wurden die Antikörper-Fusionsproteine mit der scFv:CD70-Verankerungsdomäne an der HC und scFv:PDL1-Verankerungsdomäne an der LC (A, oben) und scFv:CD70-Verankerungsdomäne an der LC und scFv:PDL1-Verankerungsdomäne an der HC (A, unten), sowie die Antikörper-Fusionsproteine mit der scFv:BCMA-Verankerungsdomäne an der HC und scFv:PDL1-Verankerungsdomäne an der LC (B, oben) und scFv:BCMA-Verankerungsdomäne an der LC und scFv:PDL1-Verankerungsdomäne an der HC (B, unten) verglichen.

IL-8: Interleukin-8

Um eine potenzielle Interaktion gleicher scFv-Verankerungsdomänen auszuschließen (s. Abb. 9(B), (D), unten) und auch um den CD40-Agonismus durch eine duale Verankerungsmöglichkeit zu erweitern, wurden Antikörper-Fusionsproteine mit unterschiedlichen scFv-Verankerungsdomänen an HC und LC hinsichtlich ihrer agonistischen Aktivität geprüft, wobei zunächst die -scFv:CD70 mit -scFv:PDL1 (s. Abb. 10(A)) und -scFv:BCMA mit -scFv:PDL1 (s. Abb. 10(B)) evaluiert wurden. Dabei blieb der

Versuchsaufbau im Wesentlichen gleich, wobei HEK293-Transfektanten als Mix zugegeben wurden, die die jeweiligen scFv-Verankerungsdomänen einzeln exprimieren. Wie in Abb. 10 zu erkennen ist, kam es durch die Inkubation von HT1080-CD40-Zellen mit α CD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:CD70-LC:scFv:PDL1 (s. Abb. 10(A), oben) bzw. α CD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:PDL1-LC:scFv:CD70 (s. Abb. 10(A), unten) in Gegenwart der jeweiligen HEK293-PDL1/HEK293-CD70-Transfektanten ab einer Konzentration der Antikörper-Fusionsproteine von ca. 15 ng/ml für α CD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:CD70-LC:scFv:PDL1, bzw. von ca. 22ng/ml für α CD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:PDL1-LC:scFv:CD70 zu einer sichtbaren Differenz der IL-8 Produktion im Vergleich zu Ko-Kulturen mit den HEK293-EV-Zellen. Dabei war die Antikörper-Fusionsprotein-vermittelte Aktivitätsdifferenz der HT1080-CD40-Zellen zwischen Leervektor- und den jeweiligen mit Expressionsplasmiden transfizierten HEK293-Zellen zwar erkennbar, jedoch weiterhin nicht so stark ausgeprägt wie im Vergleich mit den Antikörper-Fusionsproteinen mit nur einer scFv-Verankerungsdomäne an HC oder LC.

Weiterhin war zu beobachten, dass bei Zugabe der einzelnen HEK293-Transfektanten (CD70 bzw. PDL1) eine maximale IL-8 Produktion von ca. 6,0-6,4 ng/ml erreicht wurde. Bei Inkubation sowohl mit HEK293-PDL1 und HEK293-CD70 Zellen wurde die maximale IL-8 Produktion der HT1080-CD40-Zellen geringfügig auf 7,4-7,6 ng/ml gesteigert. Ähnliches ließ sich für die Antikörper-Fusionsproteine α CD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:BCMA-LC:scFv:PDL1 (s. Abb. 10(B), oben) und α CD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:PDL1-LC:scFv:BCMA (s. Abb. 10(B), unten) beobachten.

Eine sichtbare Differenz der IL-8 Induktion bei Inkubation der jeweiligen Antikörper-Fusionsproteine mit HT1080-CD40-Zellen in Gegenwart von HEK293-BCMA/HEK293-PDL1 Zellen zeigte sich ab einer Konzentration von ca. 260 ng/ml für α CD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:BCMA-LC:scFv:PDL1 (s. Abb. 10(B), oben) bzw. von ca. 90 ng/ml für α CD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:PDL1-LC:scFv:BCMA (s. Abb. 10(B), unten). Dabei war die

Antikörper-Fusionsprotein-vermittelte Aktivitätsdifferenz der HT1080-CD40-Zellen zwischen mit Leervektor- und mit jeweiligen Expressionsplasmiden transfizierten HEK293-Zellen vergleichbar mit derjenigen der Antikörper-Fusionsproteine α CD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:CD70-LC:scFv:PDL1 und α CD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:PDL1-LC:scFv:CD70 (vgl. Abb. 10(A), (B)).

Die maximale IL-8-Induktion der Antikörper-Fusionsproteine mit scFv:BCMA/scFv:PDL1-Verankerungsdomänen belief sich bei Zugabe der einzelnen HEK293-Transfektanten (BCMA bzw. PDL1) auf ca. 3,4 – 5 ng/ml. Bei Inkubation sowohl mit HEK293-PDL1- und HEK293-BCMA-Zellen wurde die maximale IL-8-Produktion der HT1080-CD40-Zellen ebenfalls geringfügig auf 7-7,4 ng/ml gesteigert.

Tabelle 7: Aktivierung von CD40 durch CD40-spezifische Antikörper-Fusionsproteine mit unterschiedlichen scFv-Verankerungsdomänen an HC und LC

EC₅₀-Werte wurden aus Abbildung 10 erhoben.

^a: Maximalkonzentration der Antikörper-Fusionsproteine als Näherungswert, wenn aufgrund des Kurvenverlaufs der entsprechende EC₅₀-Wert bei Inkubation mit HEK293-EV nicht ableitbar war.

EC₅₀: mittlere effektive Konzentration

Antikörper			
α CD40(C)-IgG1(N297A)- HC:scFv:CD70-LC:scFv:PDL1	EC ₅₀ HEK-EV [ng/ml]	EC ₅₀ HEK-CD70 [ng/ml]	Quotient EC ₅₀ HEK-EV / EC ₅₀ HEK-CD70
	210	36	6
	EC ₅₀ HEK-EV [ng/ml]	EC ₅₀ HEK-PDL1	Quotient EC ₅₀ HEK-EV / EC ₅₀ HEK-PDL1
	202	54	4
	EC ₅₀ HEK-EV [ng/ml]	EC ₅₀ HEK-CD70 + HEK-PDL1	Quotient EC ₅₀ HEK-EV / EC ₅₀ HEK-CD70+ HEK-PDL1
	560	34	17
α CD40(C)-IgG1(N297A)- HC:scFv:PDL1-LC:scFv:CD70	EC ₅₀ HEK-EV [ng/ml]	EC ₅₀ HEK-CD70 [ng/ml]	Quotient EC ₅₀ HEK-EV / EC ₅₀ HEK-CD70
	248	84	3
	EC ₅₀ HEK-EV	EC ₅₀ HEK-PDL1	Quotient

	[ng/ml]		EC₅₀ HEK-EV / EC₅₀ HEK-PDL1
	239	51	5
	EC₅₀ HEK-EV [ng/ml]	EC₅₀ HEK-CD70 + HEK-PDL1	Quotient EC₅₀ HEK-EV / EC₅₀ HEK-CD70+ HEK-PDL1
	866	75	11
αCD40(C)-IgG1(N297A)- HC:scFv:BCMA-LC:scFv:PDL1	EC₅₀ HEK-EV [ng/ml]	EC₅₀ HEK-BCMA [ng/ml]	Quotient EC₅₀ HEK-EV / EC₅₀ HEK-BCMA
	4172	1268	3,3
	EC₅₀ HEK-EV [ng/ml]	EC₅₀ HEK-PDL1 [ng/ml]	Quotient EC₅₀ HEK-EV / EC₅₀ HEK-PDL1
	4874	1159	4,2
	EC₅₀ HEK-EV [ng/ml]	EC₅₀ HEK-BCMA + HEK-PDL1 [ng/ml]	Quotient EC₅₀ HEK-EV / EC₅₀ HEK-PDL1
5000 ^a	957	>5,2	
αCD40(C)-IgG1(N297A)- HC:scFv:PDL1-LC:scFv:BCMA	EC₅₀ HEK-EV [ng/ml]	EC₅₀ HEK-BCMA [ng/ml]	Quotient EC₅₀ HEK-EV / EC₅₀ HEK-BCMA
	1041	945	1,2
	EC₅₀ HEK-EV [ng/ml]	EC₅₀ HEK-PDL1 [ng/ml]	Quotient EC₅₀ HEK-EV / EC₅₀ HEK-PDL1
	1245	526	2,4
	EC₅₀ HEK-EV [ng/ml]	EC₅₀ HEK-BCMA + HEK-PDL1 [ng/ml]	Quotient EC₅₀ HEK-EV / EC₅₀ HEK-BCMA + HEK-PDL1
5000 ^a	330	>15	

In Tabelle 7 sind die gewonnenen EC₅₀-Werte der IL-8 ELISA der Abbildung 10 aufgezeigt. Dabei wurden für jedes CD40-spezifische Antikörper-Fusionsprotein mit zwei unterschiedlichen scFv-Verankerungsdomänen drei EC₅₀-Werte erhoben: Ein Wert für die Aktivität nach Immobilisierung durch die scFv-Verankerungsdomäne an der HC, ein weiterer Wert für die durch die scFv-Verankerungsdomäne an der LC erreichte Verankerungsdomäne, und ein dritter durch die Immobilisierung beider scFv-Verankerungsdomänen an HC

und LC. Dabei erfolgte zu jedem der jeweiligen EC₅₀-Werte der direkte Vergleich zu den jeweiligen EC₅₀ HEK-EV-Werte.

Hierbei zeigten sich für die EC₅₀-Werte von α CD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:CD70-LC:scFv:PDL1 mit 34-54 ng/ml, sowie von α CD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:PDL1-LC:scFv:CD70 mit 51-84 ng/ml entsprechend niedrigere EC₅₀-Werte im Vergleich zu den Antikörper-Fusionsproteinen mit gleicher scFv-Verankerungsdomäne an HC und LC (vgl. Tab. 7 und Tab. 6). Es waren also ähnliche Konzentration notwendig, um eine halbmaximale IL-8-Induktion hervorzurufen, wie bei Antikörper-Fusionsproteinen mit nur einer scFv-Verankerungsdomäne an HC oder LC. Im Kontrast dazu standen α CD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:BCMA-LC:scFv:PDL1 mit EC₅₀-Werten von 900-1268 ng/ml und α CD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:PDL1-LC:scFv:BCMA mit 330-945 ng/ml, die weitaus höher waren. Weiterhin zeigten sich ähnliche EC₅₀ HEK-EV-Werte für α CD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:CD70-LC:scFv:PDL1 von 202-560 ng/ml und 239-866 ng/ml für α CD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:PDL1-LC:scFv:CD70 im Vergleich zu Antikörper-Fusionsproteine mit α CD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:CD70-LC:scFv:CD70 und α CD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:PDL1-LC:scFv:PDL1, wohingegen die EC₅₀ HEK-EV-Werte für α CD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:BCMA-LC:scFv:PDL1 mit 4172-5000ng/ml weitaus höher waren, ähnlich α CD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:BCMA-LC:scFv:BCMA. Für α CD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:CD70-LC:scFv:PDL1 und α CD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:PDL1-LC:scFv:CD70 zeigte sich also eine deutliche immobilisationsunabhängige IL-8-Induktion, wohingegen dieser Effekt für α CD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:BCMA-LC:scFv:PDL1 und α CD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:PDL1-LC:scFv:BCMA vermindert war. Interessanterweise kam es bei allen Antikörper-Fusionsproteinen mit unterschiedlichen scFv-Verankerungsdomänen bei einer Immobilisation über beide scFv-Verankerungsdomänen an HC und LC zu einer Steigerung des EC₅₀-Quotienten. Es schien also ein gesteigerter immobilisationsabhängiger Agonismus vorzuliegen, wenn die Immobilisierung über beide scFv-Verankerungsdomänen gewährleistet wurde. Dieser Effekt war vor allem

bei α CD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:PDL1-LC:scFv:BCMA, α CD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:PDL1-LC:scFv:CD70 und α CD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:CD70-LC:scFv:PDL1 zu beobachten. Es kam zu einer Steigerung des EC₅₀-Wertes um den Faktor 3 bis 4 im Vergleich zu den EC₅₀-Werten, die mittels Immobilisierung durch eine scFv-Verankerungsdomäne erhoben wurden (vgl. Tab 7).

Es besteht also die Möglichkeit, eine breitere Spezifität mittels unterschiedlicher scFv-Verankerungsdomänen zu gewährleisten, die aber auch weiterhin von der jeweiligen Kombination der scFv-Verankerungsdomänen, sowie von der Lokalisation (an HC oder LC) abzuhängen scheint.

4.4 Produktion und Reinigung einzelner Antikörper-Fusionsproteine

Für mögliche weitere Versuche wurden einige Antikörper-Fusionsproteine und anti-CD40(C)-IgG1(N297A)-Mutante in großen Mengen produziert, um zum einen eine Aussage über die Produktionseffizienz treffen zu können, zum anderen, um diese mittels Flag-Affinitätschromatographie aufzureinigen (s. 4.5). Für die Bestimmung der Produktionseffizienz wurden erneut HEK293-Zellen mit den jeweiligen Expressionsplasmiden transfiziert. Dabei wurden für jedes Antikörper-Fusionsprotein insgesamt 11 Zellkulturplatten (145/20 mm) transfiziert, wobei maximal 7 unabhängig voneinander durchgeführte Transfektionen mittels PEI durchgeführt wurden. Nach 7-tägiger Inkubation erfolgte die Konzentrationsbestimmung wie unter 4.2 beschrieben. In Abbildung 11 ist exemplarisch der entsprechende Western-Blot für die Konstrukte α CD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:BCMA und α CD40(C)-IgG1(N297A)-LC:scFv:BCMA gezeigt. Wie aus Abbildung 11 zu erkennen ist, wurden die jeweiligen Antikörper-Fusionsproteine regelhaft wie bei den Testproduktion gut produziert.

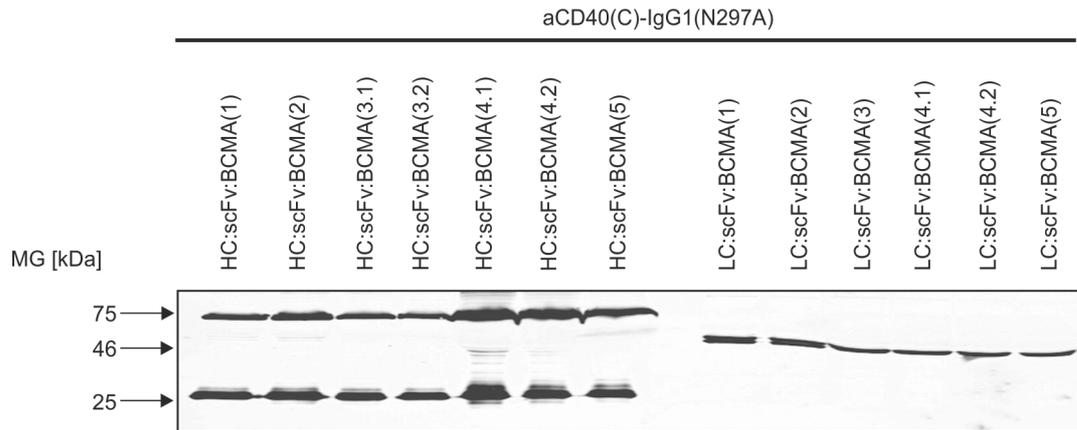


Abbildung 11: Western Blot Analyse der Produktionseffizienz der für die Aufreinigung produzierten Antikörper-Fusionsproteine.

15 µl des jeweiligen Überstandes der HEK293-Transfektanten wurde zur Konzentrationsbestimmung auf ein SDS-Gel aufgetragen und es erfolgte die Konzentrationsbestimmung mittels anti-Flag Western Blot und Flag-Proteinstandard. Abb. 11 zeigt dies exemplarisch für αCD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:BCMA und αCD40(C)-IgG1(N297A)-LC:scFv:BCMA. Ebenso wurde vorgegangen bei αCD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:PDL1, αCD40(C)-IgG1(N297A)-LC:scFv:PDL1 und αCD40(C)-IgG1(N297A). Dabei ist anzumerken, dass jede Zahl in Klammer hinter dem Konstruktnamen einer unabhängigen Transfektion entspricht. Bei Unterpunkten bspw. 3.1 und 3.2 handelt es sich um die gleiche Transfektion, jedoch wurden die jeweiligen Überstände der HEK293 Platten nicht zusammengeführt, sondern sicherheitshalber, aufgrund von Farbunterschiedlichkeiten im Überstand, einzeln aufgetragen. MG: Molekulargewicht.
kDa: Kilodalton, MG: Molekulargewicht

In Tabelle 8 sind die erhaltenen Konzentrationen der verschiedenen Transfektionen und der daraus ermittelte Mittelwert aufgelistet.

Die anti-CD40(C)-IgG1(N297A)-Mutante wurde erneut mit einem Mittelwert von 54 µg/ml überdurchschnittlich gut produziert (vgl. Tab. 8 mit Tab. 3, 39 µg/ml).

Die Produktionseffizienz der Antikörper-Fusionsproteine mit einer scFv-Verankerungsdomäne an der HC belief sich für αCD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:PDL1 auf 17 µg/ml (vgl. Tab. 8 mit Tab 3, 48 µg/ml) und für αCD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:BCMA auf 19 µg/ml (vgl. Tab. 8 mit Tab. 3, 22 µg/ml).

Die Produktionseffizienz der entsprechenden Antikörper-Fusionsproteine mit der scFv-Verankerungsdomäne an der LC belief sich für αCD40(C)-IgG1(N297A)-LC:scFv:PDL1 auf 8 µg/ml (vgl. Tab. 8 mit Tab. 3, 12 µg/ml) und für αCD40(C)-IgG1(N297A)-LC:scFv:BCMA auf 5 µg/ml (vgl. Tab. 8 mit Tab. 3, 20 µg/ml). Hier ist eine deutliche Diskrepanz zwischen der Testproduktion und dem Mittelwert der Produktionseffizienz für αCD40(C)-IgG1(N297A)-LC:scFv:BCMA auffällig.

Tabelle 8: Tabellarische Auflistung der HEK293-Produktivität der Antikörper-Fusionsproteine.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels anti-Flag Western Blot, wobei ein definierter Flag-Proteinstandard bekannter Konzentration ebenfalls aufgetragen wurde.
Konz.: Konzentration, MW: Mittelwert

Antikörper	Konz.1 [µg/ml]	Konz.2 [µg/ml]	Konz.3 [µg/ml]	Konz.4 [µg/ml]	Konz.5 [µg/ml]	Konz.6 [µg/ml]	Konz.7 [µg/ml]	MW [µg/ml]
αCD40(C)-IgG1(N297A)	84	81	14	67	56	48	25	54
αCD40(C)-IgG1(N297A) -HC:scFv:PDL1	17	16	15	19	16	/	/	17
αCD40(C)-IgG1(N297A) -LC:scFv:PDL1	9	10	10	7	6	/	/	8
αCD40(C)-IgG1(N297A) -HC:scFv:BCMA	21	26	19	27	19	/	/	22
αCD40(C)-IgG1(N297A) -LC:scFv:BCMA	9	5	4	4	4	/	/	5

Die Überstände wurden anschließend gepooled und mittels Anti-Flag-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die Kontrolle der Aufreinigung erfolgte mittels SDS-Page und Western Blot sowie mittels Silbergefärbung. In Abbildung 12 sind die Aufträge, Durchläufe und Eluate beispielhaft für αCD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:BCMA und αCD40(C)-IgG1(N297A)-LC:scFv:BCMA aufgeführt.

Klar zu erkennen war die vielfach höhere Konstrukte-Konzentration in den Eluaten gegenüber den nicht aufgereinigten Ausgangsproben (Auftrag). Ferner sind teilweise im Durchlauf Konstruktbanden zu erkennen. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass eine größere Gesamtkonstruktproteinmenge im Auftrag von αCD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:BCMA vorhanden war, die nicht komplett von den Beads gebunden werden konnte.

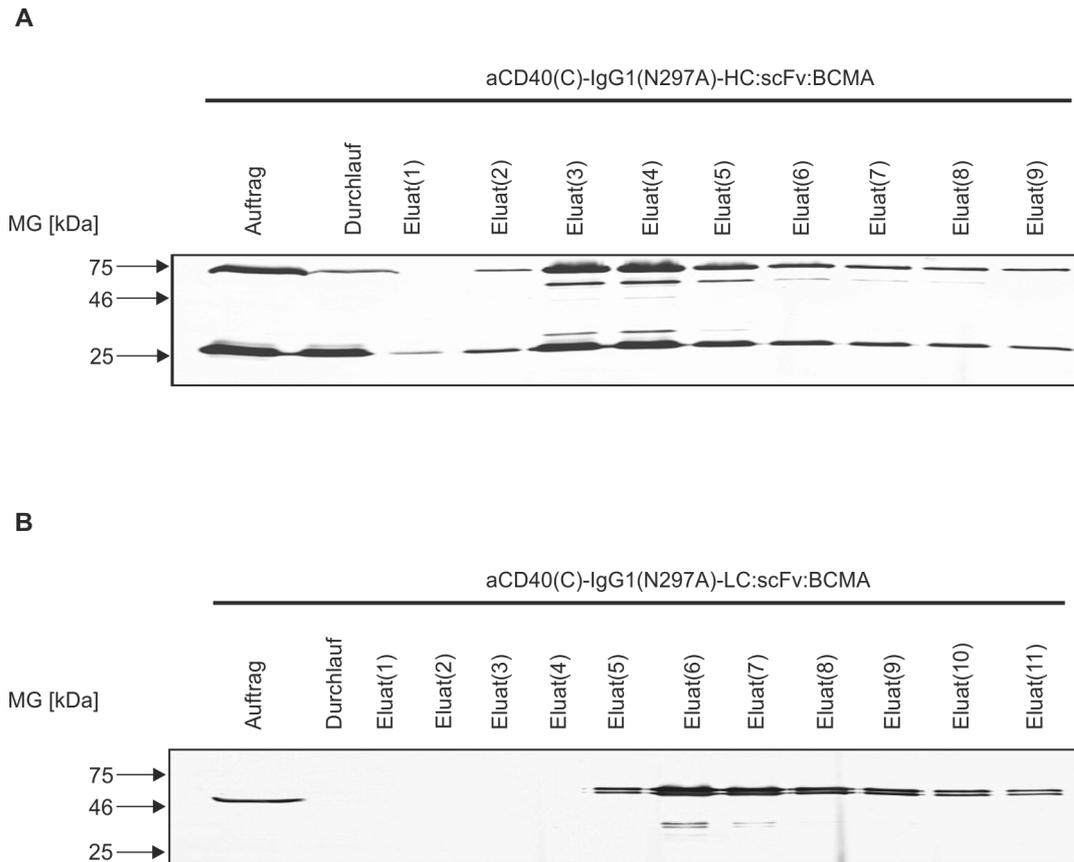


Abbildung 12: Western Blot Analyse nach Aufreinigung der Antikörper-Fusionsproteine am Beispiel αCD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:BCMA und αCD40(C)-IgG1(N297A)-LC:scFv:BCMA.

Aufgetragen wurden 20 µl der nicht aufgereinigten Auftragsprobe, 20 µl des Durchlaufs der Säule und 1 µl der jeweiligen Eluate der aufgereinigten Antikörperfusionsproteine. Abb. 12 zeigt dies exemplarisch für αCD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:BCMA und αCD40(C)-IgG1(N297A)-LC:scFv:BCMA. Ebenso wurde vorgegangen bei αCD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:PDL1, αCD40(C)-IgG1(N297A)-LC:scFv:PDL1 und αCD40(C)-IgG1(N297A). MG: Molekulargewicht.

kDa: Kilodalton, MG: Molekulargewicht

Es erfolgte das Poolen der jeweiligen Eluate der aufgereinigten Antikörper-Fusionsproteine, sowie die Sterilfiltration. Anschließend wurden 1 µl der gepoolten Eluate mittels SDS-Page aufgetrennt und daraufhin mittels Silbergelfärbung angefärbt. Mit Hilfe des Silbergelmarkers konnte sowohl das Molekulargewicht als auch die Proteinkonzentration der einzelnen aufgereinigten Antikörper-Fusionsproteine bestimmt werden. Die jeweiligen Konzentrationen der aufgereinigten Antikörper-Fusionsproteine sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9: Tabellarische Darstellung der Konzentrationen der aufgereinigten Antikörper-Fusionsproteine

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittel Silbergefärbung anhand eines Silbergelmarkers.

Antikörper	Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]
$\alpha\text{CD40(C)-IgG1(N297A)}$	250
$\alpha\text{CD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:BCMA}$	430
$\alpha\text{CD40(C)-IgG1(N297A)-LC:scFv:BCMA}$	200
$\alpha\text{CD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:PDL1}$	280
$\alpha\text{CD40(C)-IgG1(N297A)-LC:scFv:PDL1}$	300

Wie sich aus Abbildung 13(A) ableiten lässt, war die Aufreinigung der jeweiligen Antikörper-Fusionsproteine effizient. Um einen Vergleich zur Konzentration der in den funktionellen Experimenten genutzten Antikörper-Fusionsproteine ziehen zu können, wurden, wie in Abbildung 13(B) aufgezeigt ist, 100 ng der Überstände der jeweiligen Antikörper-Fusionsproteine sowohl vom unaufgereinigten Überstand, als auch vom aufgereinigten Überstand nebeneinander aufgetragen. Es zeigte sich bei allen Banden der Antikörper-Fusionsproteine eine gleich starke Intensität der Überstände zu den jeweilig aufgereinigten Proteinen, sodass von einer richtig bestimmten Ausgangskonzentration bei den funktionalen Experimenten ausgegangen werden kann. Einzige Ausnahme bildete dabei das aufgereinigte $\alpha\text{CD40(C)-IgG1(N297A)-LC:scFv:BCMA}$ Fusionsprotein, dessen Bande etwas schwächer war im Vergleich zum Überstand, wie auch zu allen anderen Banden der anderen Antikörper-Fusionsproteine. Dies lässt vermuten, dass die Konzentrationsbestimmung des aufgereinigten Antikörper-Fusionsproteins $\alpha\text{CD40(C)-IgG1(N297A)-LC:scFv:BCMA}$ mittels Silbergelmarker fehlerhaft war und dabei eine etwas zu niedrige Konzentration bestimmt wurde.

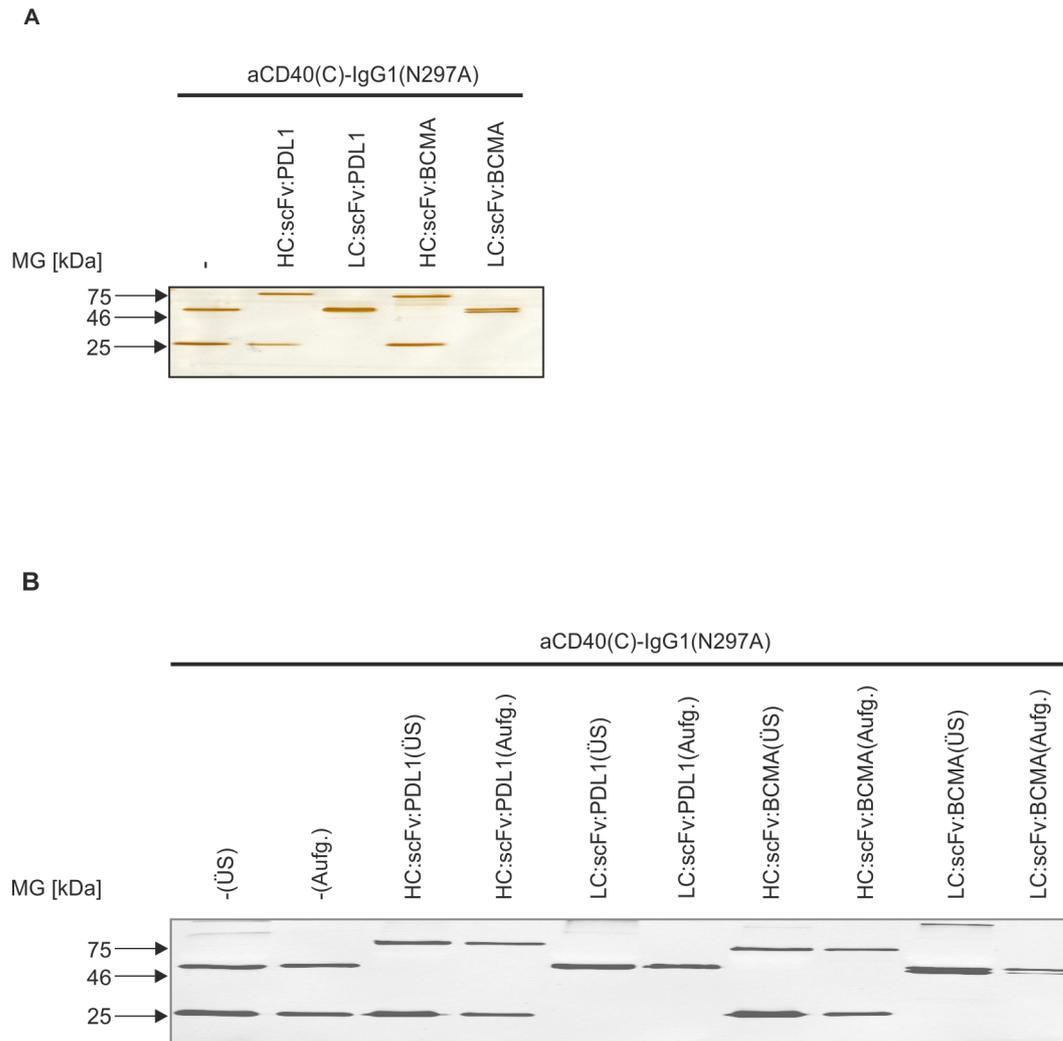


Abbildung 13: Darstellung der aufgereinigten Antikörper-Fusionsproteine mittels Silbergefärbung und Vergleich der jeweiligen Konzentrationen der Antikörper-Fusionsproteine vor und nach Aufreinigung

A: Silbergefärbung der aufgereinigten Antikörperfusionsproteine für die quantitative und qualitative Analyse der Aufreinigung.

Nach Konzentrationsbestimmung mittels Western Blot wurden 1 μ l der jeweiligen aufgereinigten Antikörperfusionsproteine auf ein SDS-Gel aufgetragen und mittels Silberfärbung zur quantitativen und qualitativen Analyse angefärbt.

B: Westernblot-Analyse des Überstandes und der aufgereinigten Antikörper-Fusionsproteine im Vergleich.

Es wurden 100 ng des mittels Western Blot bestimmten Überstandes der Antikörper-Fusionsproteine und 100 ng der aufgereinigten Antikörper-Fusionsproteine mittels Silbergefärbung nebeneinander zum Vergleich aufgetragen.

kDa: Kilodalton, MG: Molekulargewicht

5 Diskussion

Der Fokus der medikamentösen Tumorthherapie verschiebt sich zunehmend in Richtung zellspezifischer Immuntherapie, durch die das Immunsystem des Patienten gezielt genutzt wird, um eine Immunantwort gegen Tumorzellen zu initiieren. Dadurch soll -neben der effektiven antitumorösen Immunantwort- eine Schädigung körpereigener, gesunder Zellen minimiert werden (Sharma et al., 2017).

Um eine adäquate Aktivierung von Rezeptoren der TNFRSF zu gewährleisten, ist eine einfache Bindung durch dessen löslichen Liganden nicht immer ausreichend. Für die Aktivierung der Rezeptoren der TNFRSF besteht die Notwendigkeit einen supramolekularen Liganden-Rezeptor-Komplex aus oligomerisierten Liganden-Rezeptor-Trimeren zu bilden, um eine suffiziente Signalkaskadeninitiierung zu gewährleisten. Das Clustering kann durch die natürliche Membranständigkeit der Liganden der TNFSF erreicht werden, aber im Prinzip auch durch anti-TNFR-Antikörper, wenn diese Membran-„immobilisiert“ an Fc γ -Rezeptoren gebunden sind (Wajant, 2015). Aus der Fc γ -abhängigen Immobilisation solcher agonistischer Antikörper ergeben sich jedoch einige Limitationen. Die antikörpervermittelte TNFRSF-Rezeptor-Aktivierung ist abhängig von der Verfügbarkeit von Fc γ -Rezeptoren. Somit kann es durch die verbreitete Expression von Fc γ -Rezeptor positiven Zellen in unterschiedlichen Organen zur ungewollten Aktivierung von TNFRSF-Rezeptoren außerhalb des Tumors kommen und somit zu dosislimitierenden, systemischen Nebenwirkungen (White et al., 2011; Wilson et al., 2011).

Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass diese Limitationen durch Fusion mit einer Verankerungsdomäne wie scFv(s) oder Zytokinen umgangen werden kann, die die Bindung an Fc γ -Rezeptoren ersetzen (Medler et al., 2019). Ziel der hier vorgelegten Dissertationsarbeit war die Entwicklung CD40-spezifischer IgG1-Antikörper, deren Aktivierung durch Verankerung unabhängig von Fc γ -Rezeptoren über die Immobilisation via scFv-Domänen an PDL1, BCMA und CD70 vermittelt wird. Durch die scFv-Domänen der Antikörper-Fusionsproteine soll somit eine Immobilisierung und damit

einhergehend ein Agonismus nur in dem Gewebe stattfinden, in dem PDL1-, BCMA-, CD70-positive Zellen vorkommen, sodass auch nur dort eine entsprechende Immunstimulation über den CD40-bindenden Anteil der Antikörper-Fusionsproteine stattfinden kann. Ziel war es weiterhin, vor allem die Abhängigkeit des Agonismus von der Positionierung der scFv-Verankerungsdomänen am Antikörper zu beleuchten.

Es wurden daher insgesamt 18 anti-CD40 Antikörper-Fusionsproteine hergestellt und untersucht, die über Verankerungsdomänen am C-Terminus der LC, der HC oder der HC und LC verfügen. Alle Konstrukte wurden gut produziert.

Eine weitere Evaluation der Produktion hinsichtlich des Vorhandenseins von Antikörper-Aggregaten sollte für die weitere *in vitro* Testung der jeweiligen Antikörper-Fusionsproteine mittels Gelfiltration vorgenommen werden. So kann bereits während der Produktion die Bildung von dimeren oder oligomeren Antikörper-Aggregaten vorkommen, was potenziell eine scFv-immobilisierungs-unabhängige Rezeptoraktivierung zur Folge haben könnte. Unter anderem können erhöhte Mengen an intrazellulär anfallendem Protein bei der Expression der LC und HC zu einer Aggregation führen. Erhöhte pH- und Temperatur-Werte im Zellkulturmedium können ebenfalls zur Aggregation von Antikörpern führen (Vázquez-Rey and Lang, 2011). In dieser Arbeit lag der primäre Fokus jedoch auf der Funktionalitätsprüfung, weswegen auf die Gelfiltration verzichtet wurde, diese jedoch für weitere Experimente erfolgen sollte.

Die Affinitätsbestimmung der einzelnen Domänen der Antikörper-Fusionsproteine wurde mittels Bindungsstudien mit GpL-Fusionsproteinen evaluiert (Kums et al., 2017). Die Gleichgewichtsbindungsstudien zeigten, dass die Bindungsaffinität der Fab2-Domäne der Antikörper-Fusionsproteine vergleichbar ist mit der des parentalen IgG1-N297A Antikörpers. Eine Ausnahme stellt dabei das Antikörper-Fusionsprotein α CD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:PDL1-LC:GpL dar, dessen Bindung um den Faktor 10 schlechter war. Alle scFv-Verankerungsdomänen zeigten ausnahmslos eine gute Bindungsaffinität

gegenüber den jeweiligen HEK293-Transfektanten. Trotz der niedrigeren CD40-Bindungsaffinität des Antikörper-Fusionsprotein α CD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:PDL1-LC:GpL, wurde mit den jeweiligen Antikörper-Fusionsprotein-Varianten mit scFv:PDL1-Verankerungsdomänen für die weitere agonistische Aktivitätsprüfung weiterverfahren, da bereits durch Medler et al. nachgewiesen werden konnte, dass die Affinität eine untergeordnete Relevanz für die agonistische Aktivität der Antikörper zu haben scheint (Medler et al., 2019).

Zur Überprüfung der Annahme, dass nicht nur die CD40-spezifischen Antikörper-Fusionsproteine binden, sondern dass diese auch den entsprechenden Rezeptor aktivieren, erfolgte die agonistische Aktivitätsprüfung der Antikörper-Fusionsproteine über IL-8-Konzentrationsmessungen mittels ELISA. Die IL-8-Konzentrationsmessung wurde dabei als Maß für die agonistische Aktivität der Antikörper-Fusionsproteine herangezogen, da unter anderem der CD40-vermittelte NF κ B-Signalweg die IL-8-Expression induziert bzw. verstärkt und dies in Form von sekretiertem IL-8 detektiert werden kann (Hayden and Ghosh, 2012). Bei allen Antikörper-Fusionsproteinen mit scFv-Verankerungsdomänen an der HC *oder* LC bzw. an der HC *und* LC zeigte sich eine deutliche gesteigerte IL-8-Induktion in Anwesenheit von den jeweiligen PDL1-, CD70-, BCMA-positiven HEK293-Transfektanten, im Vergleich zu HEK293-Zellen, die mit einem Leervektor transfiziert wurden (vgl. Tab.6). Eine Ausnahme bildete dabei α CD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:CD70-LC:scFv:CD70, und α CD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:PDL1-LC:scFv:PDL1 bei denen nahezu kein Unterschied bestand, was sich auch in den jeweiligen EC₅₀-Werten widerspiegelt (vgl. Tab. 6). Es ist also davon auszugehen, dass die Immobilisierung und entsprechende räumliche Ausrichtung durch die scFv-Verankerungsdomänen für diese Antikörper-Fusionsproteine möglich ist, und somit auch die Möglichkeit einer Bildung und Zusammenlagerung oligomerer, transaktivierter Liganden-Rezeptor-Komplexe für die Aktivierung des CD40 Rezeptors besteht (Medler et al., 2019; Wajant, 2015).

Auffällig ist, dass bei hohen Konzentrationen von α CD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:CD70-LC, α CD40(C)-IgG1(N297A)-HC-LC:scFv:CD70, α CD40(C)-

IgG1(N297A)-HC:scFv:BCMA-LC eine gesteigerte IL-8-Induktion auch bei CD70-, BCMA- negativen HEK293-Zellen stattfindet. Dieser Effekt ist weiterhin vor allem bei α CD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:CD70-LC:scFv:CD70 und α CD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:PDL1-LC:scFv:PDL1 zu sehen. Zieht man den Vergleich zur N297A-Mutante ohne scFv-Verankerungsdomäne ist die IL-8-Induktion deutlich höher. Eine mögliche Erklärung dafür könnte eine in der Produktion oder durch Lagerung entstandene Autoaggregation sein. Diese könnte durch eine pH- oder Temperatur- Schwankung bedingt sein, die zur Bildung von Dimeren oder Oligomeren der Antikörper-Fusionsproteine geführt haben könnte. Die dimeren oder oligomeren Antikörper-Fusionsproteine könnten eine Aktivierung des Rezeptors auch ohne sekundäre Immobilisierung bedingen. Dies begründet sich darin, dass die jeweiligen Antikörper-Fusionsproteine durch die Autoaggregation bereits räumlich so ausgerichtet sind, dass eine Bildung von $(\text{TNFSF}_3\text{-TNFRSF}_3)_2$ Komplexen möglich ist (Gomez et al., 2012; Wu et al., 2014).

Insgesamt scheinen die Antikörper-Fusionsproteine mit einer scFv-Verankerungsdomäne an der HC ein ähnliches agonistisches Potenzial aufzuweisen wie Antikörper-Fusionsproteine mit scFv-Verankerungsdomäne an der LC und sie scheinen den Antikörper-Fusionsproteinen mit scFv-Verankerungsdomänen sowohl an HC als auch LC überlegen zu sein, was sich in den sinkenden EC_{50} -Wert-Quotienten in (vgl. Tab. 6) widerspiegelt.

Die Antikörper-Fusionsproteine α CD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:CD70-LC:scFv:CD70, α CD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:PDL1-LC:scFv:PDL1 zeigten im Vergleich zu den Antikörper-Fusionsproteinen mit nur einer scFv-Verankerungsdomäne an HC oder LC keinen Zugewinn, sondern scheinen sowohl bei mit Leervektor transfizierten HEK293-Zellen, wie auch bei den jeweiligen PDL1-, CD70-, positiven HEK293-Transfektanten eine ähnlich hohe IL-8-Induktion in den HT1080-CD40-Zellen hervorzurufen. Eine mögliche Erklärung könnte hierfür eine hohe Tendenz der scFv-vermittelten Interaktion und Aggregatbildung sein. Über die vermehrt vorkommenden scFv-Fragmente könnte es über komplementäre Ig-Domänen benachbarter scFv-Domänen zur

Interaktion derselben kommen und so eine Oligomerisierung bedingen. Dadurch könnte eine scFv-immobilisationsunabhängige CD40 Rezeptoraktivierung durch bestehende scFv-vermittelte Antikörper-Aggregate vermittelt werden (Gil and Schrum, 2013). ScFv-Domänen bestehen aus einer V_H- und V_L-Domäne, die über einen Peptidlinker gentechnisch miteinander verknüpft sind. Dabei können die V_H- und V_L-Domänen aufgrund von Instabilitäten auseinander dissoziieren und somit hydrophobe Aminosäuren freilegen, die wiederum mit anderen Aminosäuren anderer V_H- und V_L-Domänen interagieren und somit zu einer Aggregatbildung führen. Um die Stabilität der V_H- und V_L- Schnittstelle zu verstärken, können über einen vermehrten Einbau von Cysteinen stabilisierende Disulfidbrücken ausgebildet werden, die ein Auseinanderdiffundieren der V_H- und V_L- Domänen verhindern (Wörn and Plückthun, 2001). Eine weitere stabilisierende Möglichkeit besteht in der Bildung von zyklischen scFvs durch kovalente Bindung des N-Terminus der V_H-Domäne mit dem C-Terminus der V_L-Domäne der scFvs (Yamauchi et al., 2019). Weiterhin werden bei der gentechnischen Generierung von scFvs die Schnittstellen der V_H zu C_{H1} und V_L zu C_L freigelegt, wodurch weitere hydrophobe Aminosäuren demaskiert werden, die wiederum zu Aggregatbildung führen können. Durch die Einführung von Punktmutationen können diese hydrophoben Aminosäuren durch hydrophile ersetzt werden und somit ebenfalls die Tendenz zur Aggregation verringern (Nieba et al., 1997). Eine weitere Ursache für die Aggregation könnte die Länge der Aminosäuresequenz der Peptidlinker, die die HCs und LCs der scFv-Domänen verbinden, sein, wobei vor allem kurze Peptidlinker ein höheres Aggregationspotenzial aufwiesen und zur Ausbildung von Diabodies, Triabodies und Tetrabodies führen können (Gil and Schrum, 2013).

Die Wahrscheinlichkeit dieser Aggregat-Bildungen könnte durch die erhöhte Anzahl an scFv-Verankerungsdomänen in den Konstrukten mit einer scFv an der LC und HC erhöht sein.

Weiterhin könnte für die Wahrscheinlichkeit der Aggregat-Bildung die jeweilige scFv-Verankerungsdomäne eine entscheidende Rolle spielen, da α CD40(C)-IgG1(N297A)-HC:scFv:BCMA-LC:scFv:BCMA als einziges

Antikörper-Fusionsprotein mit vier scFv-Verankerungsdomänen (2x LC + 2x HC) eine gesteigerte IL-8-Induktion in Anwesenheit von BCMA positiven HEK293-Transfektanten im Vergleich zu HEK293-Zellen, die mit einem Leervektor transfiziert wurden, bewirkt (vgl. EC₅₀-Werte Tab. 6). Aufgrund dieser Tatsache wurden die jeweiligen scFv-Verankerungsdomänen -scFv:PDL1 und -scFv:BCMA, sowie -scFv:PDL1 und -scFv:CD70 untereinander kombiniert, um gegebenenfalls durch verschiedene scFv-Verankerungsdomänen die oben beschriebene Interaktion der jeweiligen scFvs vermeiden zu können.

Bei allen anti-CD40-scFv-Fusionsproteinen mit -HC:scFv:CD70-LC:scFv:PDL1, -HC:scFv:PDL1-LC:scFv:CD70, -HC:scFv:BCMA-LC:scFv:PDL1 und -HC:scFv:PDL1-LC:scFv:BCMA zeigte sich im Vergleich zu denen, die nur eine scFv-Verankerungsdomäne an der HC oder LC aufweisen, eine verringerte Effektstärke (vgl. EC₅₀-Werte Tab. 6 und Tab. 7). Jedoch kam es in Anwesenheit von CD70- und PDL1- positiven HEK293-Zellen vor allem für anti-CD40-scFv-Fusionsproteine mit -HC:scFv:CD70-LC:scFv:PDL1 und -HC:scFv:PDL1-LC:scFv:CD70, sowie BCMA- und PDL1-positiven Zellen für -HC:scFv:PDL1-LC:scFv:BCMA zu einer Effektsteigerung gegenüber nur einzeln positiven HEK293-Zellen (vgl. EC₅₀ Werte Tab. 7). Interessant ist der Vergleich der Effektstärke von anti-CD40-scFv-Fusionsproteinen mit -HC:scFv:CD70-LC:scFv:PDL1, -HC:scFv:PDL1-LC:scFv:CD70 und -HC:scFv:PDL1-LC:scFv:BCMA zu anti-CD40-scFv-Fusionsproteinen mit -HC:scFv:PDL1-LC:scFv:PDL1 und -HC:scFv:CD70-LC:scFv:CD70. Die Antikörper-Fusionsproteine mit unterschiedlichen scFv-Verankerungsdomänen zeigten einen größeren EC₅₀-Wert. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass unterschiedliche scFv-Verankerungsdomänen ein geringeres Aggregationspotenzial aufweisen könnten, dies sollte aber in weiteren Experimenten genauer evaluiert werden.

Trotz der niedrigeren Effektstärke gegenüber Antikörper-Fusionsproteinen, die nur eine scFv-Verankerungsdomäne an der HC bzw. LC aufweisen, könnten die Antikörper-Fusionsprotein-Varianten mit unterschiedlichen scFv-Verankerungsdomänen eine interessante Variante antiCD40-spezifischer

Antikörper sein. Anhand der Möglichkeit, mehrere unterschiedliche Tumorantigene zu binden, könnten potenzielle Tumorevasionsstrategien einen geringeren Effekt auf die agonistische Aktivität dieser Varianten haben. So könnte beispielsweise bei Inkubation von BCMA+/PDL1+ Tumorzellen oder CD70+/PDL1+ Tumorzellen mit den jeweiligen CD40-spezifischen Antikörper-Fusionsproteinen mit den jeweiligen scFv-Verankerungsdomänen bei Verlust eines der Oberflächenantigene die immunstimulatorische Komponente der Antikörper-Fusionsproteine im Gegensatz zu den Antikörper-Fusionsproteine mit nur einer Verankerungsdomäne erhalten bleiben, da eine Immobilisierung weiterhin über die zweite scFv-Verankerungsdomäne möglich wäre. Für weitere Experimente könnten weitere scFv-Kombinationen evaluiert werden. Möglicherweise könnte durch weitere Kombinationen unterschiedlicher scFv-Verankerungsdomänen die Aggregation und Interaktion der jeweiligen scFv-Verankerungsdomänen umgangen werden, um so zukünftig trispezifische Antikörper-Fusionsproteine in der Antitumor-Therapie nutzen zu können. Dies muss zunächst in weiteren *in vitro* Studien geklärt werden.

Die Antikörper-Fusionsproteine mit scFv:PDL1-Verankerungsdomäne weisen eine potenzielle bifunktionelle Aktivität auf. PDL1 ist ein Oberflächenprotein, welches unter anderem auf B-Zellen von Hodgkin Lymphomen überexprimiert vorkommt und über die Bindung des korrespondierenden Rezeptors PD1, der auf T-Zellen exprimiert wird, eine T-Zell vermittelte Immunantwort gegen Tumorzellen unterdrückt (Hu et al., 2018). Diese Unterdrückung der T-Zell-abhängigen Immunantwort durch Tumorzellen, könnte durch die Antikörper-Fusionsproteine mit scFv:PDL1-Verankerungsdomäne durch Blockierung von PDL1 auf Tumorzellen umgangen werden, wie es bereits durch andere Anti-PDL1-Antikörper klinisch gezeigt werden konnte (Konstantinidou et al., 2018). Da in dieser Arbeit jedoch die Bindungsaffinität der jeweiligen scFv-Domänen untersucht wurde, aber keine antagonistische Aktivitätsprüfung erfolgte, sollte dies für zukünftige Experimente evaluiert werden. Tatsächlich konnte mittlerweile von der AG Wajant in Folgeexperimenten nachgewiesen

werden, dass die scFv:PDL1-Domäne die PD1-PDL1-Interaktion effektiv blockiert (Mitteilung Prof. H. Wajant).

6 Zusammenfassung

Das Immunsystem zu aktivieren, um eine körpereigene Immunantwort gegen Tumorzellen hervorzurufen, ist ein innovativer Therapieansatz. Eine vielversprechende Zielstruktur hierfür ist CD40, ein Mitglied der TNFRSF-Familie und starker Stimulator Antigen-präsentierender Zellen.

Die TNFRSF-Rezeptor Aktivierung ist abhängig von der Bildung oligomerer $(TNFSF_3-TNFRSF_3)_2$ Komplexe, was insbesondere durch entsprechende räumliche Ausrichtung membranständiger Liganden und deren hohe lokale Konzentration im Zell-Zell-Kontakt gewährleistet wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die $(TNFSF_3-TNFRSF_3)_2$ Komplexbildung mittels membranständiger Liganden durch die Generierung von CD40-spezifischen Antikörper-Fusionsproteinen imitiert, die über zusätzliche Bindedomänen, *single chain fragment variable* (scFvs), für zellständige Zielstrukturen (CD70, BCMA, PDL1) verfügen. Dazu wurden die schweren und/oder leichten anti-CD40 Antikörperketten C-terminal mit einem scFv-Fragment verknüpft und dadurch verschiedene CD40-spezifische Antikörper-Fusionsproteine mit scFv-Fragmenten generiert.

Die Funktionalität dieser besonderen Antikörper-Fusionsproteine wurde hinsichtlich ihrer Bindungsfähigkeit mittels *Gaussia princeps* Luciferaseassay und hinsichtlich ihres Agonismus über den Nachweis der Interleukin-8 Induktion per ELISA analysiert. Dabei zeigte sich, dass die CD40-Aktivierung durch die an den Antikörper-Fusionsproteinen verankerten scFv-Domänen bei einem Großteil potenziert werden konnte, wenn diese die entsprechenden Zielantigene CD70, BCMA, PDL1 binden. Des Weiteren waren hinsichtlich ihres Agonismus die Antikörper-Fusionsproteine mit einer scFv-Domäne an der schweren oder an der leichten Antikörperkette den Antikörper-Fusionsproteinen überlegen, die scFv-Domänen an beiden Antikörperketten aufwiesen. Dennoch stellen auch letztere eine vielversprechende Therapievariante dar, da sie aufgrund ihrer breiteren Spezifität verschiedene Tumorantigene binden können. Die in dieser Arbeit produzierten und charakterisierten CD40-spezifischen Antikörper-Fusionsproteine aktivieren das Immunsystem gezielter in dem Gewebe, in dem vermehrt spezifische Tumorantigene exprimiert werden. Dadurch eröffnen sie neue Möglichkeiten in der Tumorthherapie.

7 Literaturverzeichnis

- Aggarwal, B.B., Gupta, S.C., Kim, J.H., 2012. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood* 119, 651–665. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-04-325225>
- Ahamadi-Fesharaki, R., Fateh, A., Vaziri, F., Solgi, G., Siadat, S.D., Mahboudi, F., Rahimi-Jamnani, F., 2019. Single-Chain Variable Fragment-Based Bispecific Antibodies: Hitting Two Targets with One Sophisticated Arrow. *Mol. Ther. Oncolytics* 14, 38–56. <https://doi.org/10.1016/j.omto.2019.02.004>
- Ahmad, Z.A., Yeap, S.K., Ali, A.M., Ho, W.Y., Alitheen, N.B.M., Hamid, M., 2012. scFv Antibody: Principles and Clinical Application. *Clin. Dev. Immunol.* 2012, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2012/980250>
- Apostolaki, M., Armaka, M., Victoratos, P., Kollias, G., 2010. Cellular Mechanisms of TNF Function in Models of Inflammation and Autoimmunity, in: Kollias, G., Sfrikakis, P.P. (Eds.), *Current Directions in Autoimmunity*. KARGER, Basel, pp. 1–26. <https://doi.org/10.1159/000289195>
- Baud, V., Karin, M., 2001. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol.* 11, 372–377. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(01\)02064-5](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(01)02064-5)
- Beatty, G.L., Li, Y., Long, K.B., 2017. Cancer immunotherapy: activating innate and adaptive immunity through CD40 agonists. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 17, 175–186. <https://doi.org/10.1080/14737140.2017.1270208>
- Beinke, S., Ley, S.C., 2004. Functions of NF- κ B1 and NF- κ B2 in immune cell biology. *Biochem. J.* 382, 393–409. <https://doi.org/10.1042/BJ20040544>
- Beutler, B.A., Milsark, I.W., Cerami, A., 1985. Cachectin/tumor necrosis factor: production, distribution, and metabolic fate in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 135, 3972–3977.
- Bishop, G.A., Moore, C.R., Xie, P., Stunz, L.L., Kraus, Z.J., 2007. TRAF proteins in CD40 signaling. *Adv. Exp. Med. Biol.* 597, 131–151. https://doi.org/10.1007/978-0-387-70630-6_11
- Bodmer, J.-L., Schneider, P., Tschopp, J., 2002. The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem. Sci.* 27, 19–26.
- Bonizzi, G., Karin, M., 2004. The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* 25, 280–288. <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.03.008>
- Brandsma, A.M., Jacobino, S.R., Meyer, S., ten Broeke, T., Leusen, J.H.W., 2015. Fc receptor inside-out signaling and possible impact on antibody therapy. *Immunol. Rev.* 268, 74–87. <https://doi.org/10.1111/imr.12332>
- Brezski, R.J., Georgiou, G., 2016. Immunoglobulin isotype knowledge and application to Fc engineering. *Curr. Opin. Immunol., Antigen processing **

Special section: New concepts in antibody therapeutics 40, 62–69.
<https://doi.org/10.1016/j.coi.2016.03.002>

- Bruhns, P., Iannascoli, B., England, P., Mancardi, D.A., Fernandez, N., Jorieux, S., Daeron, M., 2009. Specificity and affinity of human Fc receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood* 113, 3716–3725. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-09-179754>
- Buhtoiarov, I.N., Lum, H.D., Berke, G., Sondel, P.M., Rakhmilevich, A.L., 2006. Synergistic Activation of Macrophages via CD40 and TLR9 Results in T Cell Independent Antitumor Effects. *J. Immunol.* 176, 309–318. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.1.309>
- Cao, J., Meng, F., Gao, X., Dong, H., Yao, W., 2011. Expression and purification of a natural N-terminal pre-ligand assembly domain of tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1 PLAD) and preliminary activity determination. *Protein J.* 30, 281–289. <https://doi.org/10.1007/s10930-011-9330-4>
- Chan, F.K.-M., 2007. Three is Better Than One: Pre-Ligand Receptor Assembly in the Regulation of TNF Receptor Signaling. *Cytokine* 37, 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2007.03.005>
- Danese, S., Sans, M., Fiocchi, C., 2004. The CD40/CD40L costimulatory pathway in inflammatory bowel disease. *Gut* 53, 1035–1043. <https://doi.org/10.1136/gut.2003.026278>
- Delves, P.J., Roitt, I.M., 2000. The Immune System. *N. Engl. J. Med.* 343, 37–49. <https://doi.org/10.1056/NEJM200007063430107>
- Dhein, J., Daniel, P.T., Trauth, B.C., Oehm, A., Möller, P., Krammer, P.H., 1992. Induction of apoptosis by monoclonal antibody anti-APO-1 class switch variants is dependent on cross-linking of APO-1 cell surface antigens. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 149, 3166–3173.
- Dong, J., Sereno, A., Aivazian, D., Langley, E., Miller, B.R., Snyder, W.B., Chan, E., Cantele, M., Morena, R., Joseph, I.B.J.K., Boccia, A., Virata, C., Gamez, J., Yco, G., Favis, M., Wu, X., Graff, C.P., Wang, Q., Rohde, E., Rennard, R., Berquist, L., Huang, F., Zhang, Y., Gao, S.X., Ho, S.N., Demarest, S.J., Reff, M.E., Hariharan, K., Glaser, S.M., 2011. A stable IgG-like bispecific antibody targeting the epidermal growth factor receptor and the type I insulin-like growth factor receptor demonstrates superior anti-tumor activity. *mAbs* 3, 273–288. <https://doi.org/10.4161/mabs.3.3.15188>
- Elgueta, R., Benson, M.J., de Vries, V.C., Wasiuk, A., Guo, Y., Noelle, R.J., 2009. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol. Rev.* 229. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2009.00782.x>
- Engelmann, H., Holtmann, H., Brakebusch, C., Avni, Y.S., Sarov, I., Nophar, Y., Hadas, E., Leitner, O., Wallach, D., 1990. Antibodies to a soluble form of a tumor necrosis factor (TNF) receptor have TNF-like activity. *J. Biol. Chem.* 265, 14497–14504.

- Fick, A., Lang, I., Schäfer, V., Seher, A., Trebing, J., Weisenberger, D., Wajant, H., 2012. Studies of binding of tumor necrosis factor (TNF)-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) to fibroblast growth factor inducible 14 (Fn14). *J. Biol. Chem.* 287, 484–495. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.287656>
- Flick, D.A., Gifford, G.E., 1986. Pharmacokinetics of murine tumor necrosis factor. *J. Immunopharmacol.* 8, 89–97.
- Funakoshi, S., Longo, D.L., Beckwith, M., Conley, D.K., Tsarfaty, G., Tsarfaty, I., Armitage, R.J., Fanslow, W.C., Spriggs, M.K., Murphy, W.J., 1994. Inhibition of human B-cell lymphoma growth by CD40 stimulation. *Blood* 83, 2787–2794. <https://doi.org/10.1182/blood.V83.10.2787.2787>
- Ghosh, S., Karin, M., 2002. Missing Pieces in the NF- κ B Puzzle. *Cell* 109, S81–S96. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00703-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00703-1)
- Gil, D., Schrum, A.G., 2013. Strategies to stabilize compact folding and minimize aggregation of antibody-based fragments. *Adv. Biosci. Biotechnol. Print* 4, 73–84. <https://doi.org/10.4236/abb.2013.44A011>
- Gomez, N., Subramanian, J., Ouyang, J., Nguyen, M.D.H., Hutchinson, M., Sharma, V.K., Lin, A.A., Yuk, I.H., 2012. Culture temperature modulates aggregation of recombinant antibody in cho cells. *Biotechnol. Bioeng.* 109, 125–136. <https://doi.org/10.1002/bit.23288>
- Grell, M., Wajant, H., Zimmermann, G., Scheurich, P., 1998. The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 570–575.
- Hayden, M.S., Ghosh, S., 2012. NF- κ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev.* 26, 203–234. <https://doi.org/10.1101/gad.183434.111>
- Hayden, M.S., Ghosh, S., 2008. Shared Principles in NF- κ B Signaling. *Cell* 132, 344–362. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.020>
- Hayden, M.S., Ghosh, S., 2004. Signaling to NF- κ B. *Genes Dev.* 18, 2195–2224. <https://doi.org/10.1101/gad.1228704>
- Hehlgans, T., Pfeffer, K., 2005. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 115, 1–20. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2005.02143.x>
- Hess, S., Engelmann, H., 1996. A novel function of CD40: induction of cell death in transformed cells. *J. Exp. Med.* 183, 159–167. <https://doi.org/10.1084/jem.183.1.159>
- Hmiel, L.K., Brorson, K.A., Boyne, M.T., 2015. Post-translational structural modifications of immunoglobulin G and their effect on biological activity. *Anal. Bioanal. Chem.* 407, 79–94. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8108-x>

- Hoesel, B., Schmid, J.A., 2013. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. *Mol. Cancer* 12, 86. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-12-86>
- Hoffmann, A., Baltimore, D., 2006. Circuitry of nuclear factor κ B signaling. *Immunol. Rev.* 210, 171–186. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2006.00375.x>
- Hu, B., Jacobs, R., Ghosh, N., 2018. Checkpoint Inhibitors Hodgkin Lymphoma and Non-Hodgkin Lymphoma. *Curr. Hematol. Malig. Rep.* 13, 543–554. <https://doi.org/10.1007/s11899-018-0484-4>
- Kelley, S.K., Harris, L.A., Xie, D., Deforge, L., Totpal, K., Bussiere, J., Fox, J.A., 2001. Preclinical studies to predict the disposition of Apo2L/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in humans: characterization of in vivo efficacy, pharmacokinetics, and safety. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 299, 31–38.
- Konstantinidou, M., Zarganes-Tzitzikas, T., Magiera-Mularz, K., Holak, T.A., Dömling, A., 2018. Immune Checkpoint PD-1/PD-L1: Is There Life Beyond Antibodies? *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 57, 4840–4848. <https://doi.org/10.1002/anie.201710407>
- Kontermann, R.E., 2012. Dual targeting strategies with bispecific antibodies. *mAbs* 4, 182–197. <https://doi.org/10.4161/mabs.4.2.19000>
- Kornbluth, R.S., Stempniak, M., Stone, G.W., 2012. Design of CD40 Agonists and their use in growing B cells for cancer immunotherapy. *Int. Rev. Immunol.* 31. <https://doi.org/10.3109/08830185.2012.703272>
- Kroschinsky, F., Stölzel, F., von Bonin, S., Beutel, G., Kochanek, M., Kiehl, M., Schellongowski, P., 2017. New drugs, new toxicities: severe side effects of modern targeted and immunotherapy of cancer and their management. *Crit. Care* 21. <https://doi.org/10.1186/s13054-017-1678-1>
- Kums, J., Nelke, J., RÜth, B., Schäfer, V., Siegmund, D., Wajant, H., 2017. Quantitative analysis of cell surface antigen-antibody interaction using Gaussia princeps luciferase antibody fusion proteins. *mAbs* 9, 506–520. <https://doi.org/10.1080/19420862.2016.1274844>
- Lang, I., Fick, A., Schäfer, V., Giner, T., Siegmund, D., Wajant, H., 2012. Signaling active CD95 receptor molecules trigger co-translocation of inactive CD95 molecules into lipid rafts. *J. Biol. Chem.* 287, 24026–24042. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.328211>
- Li, X., Kimberly, R.P., 2014. Targeting the Fc receptor in autoimmune disease. *Expert Opin. Ther. Targets* 18, 335–350. <https://doi.org/10.1517/14728222.2014.877891>
- Liao, G., Zhang, M., Harhaj, E.W., Sun, S.-C., 2004. Regulation of the NF- κ B-inducing Kinase by Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factor 3-induced Degradation. *J. Biol. Chem.* 279, 26243–26250. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403286200>

- Liu, H., May, K., 2012. Disulfide bond structures of IgG molecules. *mAbs* 4, 17–23. <https://doi.org/10.4161/mabs.4.1.18347>
- Locksley, R.M., Killeen, N., Lenardo, M.J., 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104, 487–501.
- Magis, C., Slood, A.M. van der, Serrano, L., Notredame, C., 2012. An improved understanding of TNFL/TNFR interactions using structure-based classifications. *Trends Biochem. Sci.* 37, 353–363. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2012.06.002>
- Masuda, A., Yoshida, M., Shiomi, H., Morita, Y., Kutsumi, H., Inokuchi, H., Mizuno, S., Nakamura, A., Takai, T., Blumberg, R.S., Azuma, T., 2009. Role of Fc Receptors as a Therapeutic Target. *Inflamm. Allergy Drug Targets* 8, 80–86.
- Medler, J., Nelke, J., Weisenberger, D., Steinfatt, T., Rothaug, M., Berr, S., Hünig, T., Beilhack, A., Wajant, H., 2019. TNFRSF receptor-specific antibody fusion proteins with targeting controlled FcγR-independent agonistic activity. *Cell Death Dis.* 10. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1456-x>
- Michaelson, J.S., Demarest, S.J., Miller, B., Amatucci, A., Snyder, W.B., Wu, X., Huang, F., Phan, S., Gao, S., Doern, A., Farrington, G.K., Lugovskoy, A., Joseph, I., Bailly, V., Wang, X., Garber, E., Browning, J., Glaser, S.M., 2009. Anti-tumor activity of stability-engineered IgG-like bispecific antibodies targeting TRAIL-R2 and LTβR. *mAbs* 1, 128–141.
- Mitchell, S., Vargas, J., Hoffmann, A., 2016. Signaling via the NFκB system. *WIREs Syst. Biol. Med.* 8, 227–241. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1331>
- Nelson, A.L., Reichert, J.M., 2009. Development trends for therapeutic antibody fragments. *Nat. Biotechnol.* 27, 331–337. <https://doi.org/10.1038/nbt0409-331>
- Nieba, L., Honegger, A., Krebber, C., Plückthun, A., 1997. Disrupting the hydrophobic patches at the antibody variable/constant domain interface: improved in vivo folding and physical characterization of an engineered scFv fragment. *Protein Eng.* 10, 435–444. <https://doi.org/10.1093/protein/10.4.435>
- Nimmerjahn, F., Ravetch, J.V., 2008. Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 34–47. <https://doi.org/10.1038/nri2206>
- Nimmerjahn, F., Ravetch, J.V., 2007. Fc-Receptors as Regulators of Immunity, in: *Advances in Immunology*. Academic Press, pp. 179–204. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(07\)96005-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(07)96005-8)
- Oeckinghaus, A., Hayden, M.S., Ghosh, S., 2011. Crosstalk in NF-κB signaling pathways. *Nat. Immunol.* 12, 695–708. <https://doi.org/10.1038/ni.2065>
- Quezada, S.A., Jarvinen, L.Z., Lind, E.F., Noelle, R.J., 2004. CD40/CD154 interactions at the interface of tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 307–328. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104533>

- Radaev, S., Sun, P., 2002. Recognition of immunoglobulins by Fc γ receptors. *Mol. Immunol.*, Molecular Recognition of Immuno-receptors: A structural overview 38, 1073–1083. [https://doi.org/10.1016/S0161-5890\(02\)00036-6](https://doi.org/10.1016/S0161-5890(02)00036-6)
- Ravetch, J.V., Bolland, S., 2001. IgG Fc Receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 275–290. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.19.1.275>
- Schroeder, H.W., Cavacini, L., 2010. Structure and function of immunoglobulins. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, S41-52. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.046>
- Sharma, P., Hu-Lieskovan, S., Wargo, J.A., Ribas, A., 2017. Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. *Cell* 168, 707–723. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.01.017>
- Solan, N.J., Miyoshi, H., Carmona, E.M., Bren, G.D., Paya, C.V., 2002. RelB Cellular Regulation and Transcriptional Activity Are Regulated by p100. *J. Biol. Chem.* 277, 1405–1418. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109619200>
- Stanfield, R.L., Wilson, I.A., 2014. Antibody Structure. *Microbiol. Spectr.* 2. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.AID-0012-2013>
- Sun, S.-C., 2017. The non-canonical NF- κ B pathway in immunity and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 17, 545–558. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.52>
- Sun, S.-C., 2012. The noncanonical NF- κ B pathway. *Immunol. Rev.* 246, 125–140. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01088.x>
- Takeuchi, M., Rothe, M., Goeddel, D.V., 1996. Anatomy of TRAF2 DISTINCT DOMAINS FOR NUCLEAR FACTOR- κ B ACTIVATION AND ASSOCIATION WITH TUMOR NECROSIS FACTOR SIGNALING PROTEINS. *J. Biol. Chem.* 271, 19935–19942. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.33.19935>
- Vanamee, É.S., Faustman, D.L., 2018. Structural principles of tumor necrosis factor superfamily signaling. *Sci. Signal.* 11. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aao4910>
- Vázquez-Rey, M., Lang, D.A., 2011. Aggregates in monoclonal antibody manufacturing processes. *Biotechnol. Bioeng.* 108, 1494–1508. <https://doi.org/10.1002/bit.23155>
- Vonderheide, R.H., 2018. The immune revolution: a case for priming, not checkpoint. *Cancer Cell* 33, 563–569. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.03.008>
- Wajant, H., 2015. Principles of antibody-mediated TNF receptor activation. *Cell Death Differ.* 22, 1727–1741. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.109>
- Wang, Q., Chen, Y., Park, J., Liu, X., Hu, Y., Wang, T., McFarland, K., Betenbaugh, M.J., 2019. Design and Production of Bispecific Antibodies. *Antibodies* 8. <https://doi.org/10.3390/antib8030043>

- White, A.L., Chan, H.T.C., Roghanian, A., French, R.R., Mockridge, C.I., Tutt, A.L., Dixon, S.V., Ajona, D., Verbeek, J.S., Al-Shamkhani, A., Cragg, M.S., Beers, S.A., Glennie, M.J., 2011. Interaction with Fc RIIB Is Critical for the Agonistic Activity of Anti-CD40 Monoclonal Antibody. *J. Immunol.* 187, 1754–1763. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101135>
- Wilson, N.S., Yang, B., Yang, A., Loeser, S., Marsters, S., Lawrence, D., Li, Y., Pitti, R., Totpal, K., Yee, S., Ross, S., Vernes, J.-M., Lu, Y., Adams, C., Offringa, R., Kelley, B., Hymowitz, S., Daniel, D., Meng, G., Ashkenazi, A., 2011. An Fc γ Receptor-Dependent Mechanism Drives Antibody-Mediated Target-Receptor Signaling in Cancer Cells. *Cancer Cell* 19, 101–113. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.11.012>
- Wörn, A., Plückthun, A., 2001. Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments¹¹Edited by P. Wright. *J. Mol. Biol.* 305, 989–1010. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4265>
- Wu, H., Kroe-Barrett, R., Singh, S., Robinson, A.S., Roberts, C.J., 2014. Competing aggregation pathways for monoclonal antibodies. *FEBS Lett.* 588, 936–941. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.01.051>
- Xiao, G., Harhaj, E.W., Sun, S.-C., 2001. NF- κ B-Inducing Kinase Regulates the Processing of NF- κ B2 p100. *Mol. Cell* 7, 401–409. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00187-3](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00187-3)
- Yamamoto, Y., Gaynor, R.B., 2004. I κ B kinases: key regulators of the NF- κ B pathway. *Trends Biochem. Sci.* 29, 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2003.12.003>
- Yamauchi, S., Kobashigawa, Y., Fukuda, N., Teramoto, M., Toyota, Y., Liu, C., Ikeguchi, Y., Sato, T., Sato, Y., Kimura, H., Masuda, T., Ohtsuki, S., Noi, K., Ogura, T., Morioka, H., 2019. Cyclization of Single-Chain Fv Antibodies Markedly Suppressed Their Characteristic Aggregation Mediated by Inter-Chain VH-VL Interactions. *Molecules* 24. <https://doi.org/10.3390/molecules24142620>

Appendix

I. Abkürzungsverzeichnis

µl	Microliter
µM	Micromolar
%	Prozent
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ADCC	<i>Antibody-dependent cellular cytotoxicity</i>
ADCP	<i>Antibody-dependent cell mediated phagocytosis</i>
APCs	Antigenpräsentierende Zellen
APS	Ammoniumpersulfat
BCMA	B-cell maturation antigen
bzw.	beziehungsweise
CD40	<i>Cluster of differentiation 40-receptor</i>
CD40L	<i>Cluster of differentiation 40-ligand</i>
CDRs	<i>Complementary determining regions</i>
C _H	Konstante Domäne der schweren Kette
CIP	<i>Calf intestine alkaline phosphatase</i>
C _L	Konstante Domäne der leichten Kette
cm	Zentimeter
CRDs	<i>Cystein-rich domains</i>
DCs	dendritische Zellen
DD	Todes-Domäne
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC ₅₀	Mittlere effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunsorbent Assay
EV	<i>Empty vector</i>
Fab	<i>Fragment antigen binding</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FADD	<i>Fas-associated death domain</i>
Fb	Konstantes Fragment
Fc	<i>Fragment crystallizable</i>
FcRs	Fc-Rezeptoren
FITC	Fluoresceinisothiocyanate
Fv	variables Fragment
g	Gramm
GCs	<i>Germinal centers</i>
GITR	<i>Glucocorticoid induced TNFR related protein</i>

GpL.....	<i>Gaussia princeps</i> Luciferase
h	Stunde
HC	<i>Heavy chain</i>
hFc γ Rs.....	humane Fc gamma Rezeptoren
I κ B	<i>Inhibitor of kappa B</i>
IC.....	Immunkomplexe
IgSF.....	Immunglobulin Superfamilie
IKK.....	<i>Inhibitor of kappa B Kinase</i>
IL	Interleukin
ITAM.....	<i>immune tyrosine activating motif</i>
ITIM	<i>immune tyrosine inhibition motif</i>
kb.....	Kilobasenpaar
K _D	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
Konz	Konzentration
LB	Bakterienkulturmedium, Luria Bertani
LC.....	<i>Light chain</i>
LPS.....	Lipopolysaccharide
MAP3K	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kaskade
MG.....	Molekulargewicht
min.....	Minute
mm	Millimeter
mM	Milimolar
MMP	Matrix Metalloproteinasen
MW	Mittelwert
N297A	Punktmutation der Aminosäure Asparagin an Position 297 zu Alanin
NEMO.....	<i>NF kappa B essential modulator</i>
NF κ B	<i>Nuclear factor "kappa-light-chain-enhancer" of activated B-cells</i>
ng	Nanogramm
NIK	<i>NF kappa B inducing kinase</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBST	PBS mit Tween
PCR.....	Polymerase Kettenreaktion
PDL	programmierter Zelltod Ligand
PE.....	Phycoerythrin
PEI.....	Polyethylenimin
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PI3K.....	Phosphoinositol 3 Kinase
PLAD	<i>pre-ligand-binding assembly domain</i>
PLC γ	Phospholipase C gamma
R ²	Determinationskoeffizient
RHD.....	Rel homologe Domäne
RLU	Relative light units
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT.....	Raumtemperatur

s. siehe
scFv *single chain fragment variable*
SD Standardabweichung
SDS Natriumlaurylsulfat (Sodium Dodecyl Sulfat)
sek. Sekunde
Tab Tabelle
TBS TRIS-gepufferte Salzlösung
TEMED Tetramethyletan
THD TNF homologe Domäne
TNF Tumornekrosefaktor
TNFRSF Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie
TNFSF Tumornekrosefaktor Superfamilie
TNF α Tumornekrosefaktor alpha
TRADD *TNFR1-associated death domain*
TRAF TNF-Rezeptor assoziierte Faktoren
TRAILR *TNF-related apoptosis-inducing ligand*
U *Units*
UV Ultraviolett
V Volt
vgl vergleiche
V_H variable Domäne der schweren Kette
V_L variable Domäne der leichten Kette

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung eines IgG1 Antikörper und eines single chain fragment variable (scFv).....	5
Abbildung 2: Schematische Darstellung der TNFSF-Liganden vermittelten TNFRSF-Rezeptoraktivierung durch membranständige oder lösliche Liganden.....	15
Abbildung 3: Schematische Darstellung der produzierten Antikörper-Fusionsproteine	50
Abbildung 4: Western Blot Analyse der produzierten Antikörper-Fusionsproteine:	51
Abbildung 5: Gleichgewichtsbindungsstudien der GpL-Varianten der CD40-spezifischen Antikörper-Fusionsprotein mit HT1080-CD40-Zellen.	54
Abbildung 6: Gleichgewichtsbindungsstudien der GpL-Varianten der CD40-spezifischen Antikörper-Fusionsproteine mit transfizierten HEK293-Zellen.....	56
Abbildung 7: Übersicht der einzelnen Antikörper-Fusionsprotein-Panels	58
Abbildung 8: Transfektionseffizienz der für den IL-8 ELISA verwendete HEK293-Transfektanten	59
Abbildung 9: IL-8 ELISA zur agonistischen Aktivitätsprüfung der anti-CD40-spezifischen Antikörper-Fusionsproteine in Ko-Kulturen aus HT1080-CD40-Zellen und HEK293-Transfektanten.....	60
Abbildung 10: IL-8 ELISA zur agonistischen Aktivitätsprüfung der anti-CD40-spezifischen Antikörper-Fusionsproteine mit unterschiedlichen scFv-Verankerungsdomänen an HC und LC auf HT1080-CD40-Zellen und HEK293-Transfektanten als Ko-Kultur-Zellen.....	67

Abbildung 11: Western Blot Analyse der Produktionseffizienz der für die Aufreinigung produzierten Antikörper-Fusionsproteine.	73
Abbildung 12: Western Blot Analyse nach Aufreinigung der Antikörper-Fusionsproteine am Beispiel α CD40(C)- IgG1(N297A)-HC:scFv:BCMA und α CD40(C)-IgG1(N297A)- LC:scFv:BCMA.	75
Abbildung 13: Darstellung der aufgereinigten Antikörper-Fusionsproteine mittels Silbergefärbung und Vergleich der jeweiligen Konzentrationen der Antikörper-Fusionsproteine vor und nach Aufreinigung.....	77

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Tabellarische Darstellung der Expression einzelner humaner Fc γ -Rezeptoren (hFc γ R) auf den jeweiligen Immunzellen	10
Tabelle 2: Darstellung der klonierten Antikörper mit jeweiligen Vektoren, Templates, Primern, Restriktionsenzymen, der schweren und leichten Ketten der Antikörper-Fusionsproteine	48
Tabelle 3: Tabellarische Auflistung der Konzentrationen der einmaligen Testproduktion der Antikörper-Fusionsproteine.	52
Tabelle 4: Übersicht einzelner K _D -Werte der α CD40(C)-IgG1(N297A)-Fusionsproteine der CD40-Domäne.....	55
Tabelle 5: Übersicht der K _D -Werte der jeweiligen scFv-Verankerungsdomäne der α CD40(C)-IgG1(N297A)-Fusionsproteine für ihr Zielantigen	57
Tabelle 6: EC ₅₀ -Werte als Maßzahl der Aktivierung von CD40 durch CD40-spezifische Antikörper-Fusionsproteine	64
Tabelle 7: Aktivierung von CD40 durch CD40-spezifische Antikörper-Fusionsproteine mit unterschiedlichen scFv-Verankerungsdomänen an HC und LC	69
Tabelle 8: Tabellarische Auflistung der HEK293-Produktivität der Antikörper-Fusionsproteine.	74
Tabelle 9: Tabellarische Darstellung der Konzentrationen der aufgereinigten Antikörper-Fusionsproteine	76

IV. DNA- und Aminosäuresequenzen der klonierten Konstrukte

Flag-Tag

Variable-Domäne LC

Konstante-Domäne LC

Variable-Domäne HC

Konstante-Domäne HC

scFv-antiCD70(2H5)

scFv-anti-BCMA(C11D53)

scFv-anti-PDL1(Avelumab)

Linker

anti-CD40-C-Flag-VL-scFv:anti-CD70(2H5)-pCR3

```
1      atgaacttcggcttcagcctgatcttctcctggtgctggtgctgaagggcgtgcagtgcgaa
1      M N F G F S L I F L V L V L K G V Q C E
61     gtgaagctggtgccccggcaattggactacaaggacgacgacgacaaaagaattggacatc
21     V K L V P R Q L D Y K D D D D K E L D I
121    cagatgacacagagccccagcagcctgtctgccagcgtgggagatagagtgaccatcacc
41     Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T
181    tgtagcgcgcagcagcagcgtgtcctacatgctgtggttccagcagaagcctggcaaggcc
61     C S A S S S V S Y M L W F Q Q K P G K A
241    cctaagctgctgatctacagcacctccaatctggccagcggcgtgccaagcagattttct
81     P K L L I Y S T S N L A S G V P S R F S
301    ggctctggcagcggcaccgacttcaccctgaccatatctagcctgcagccagaggacttc
101    G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F
361    gccacctaactactgccagcagcggacattctaccctacacctttggcggaggcaccaag
121    A T Y Y C Q Q R T F Y P Y T F G G G T K
421    gtggaaatcaagggatccgaaatcaagcgtacggtggccgctcccagcgtgttcatcttc
141    V E I K G S E I K R T V A A P S V F I F
481    ccacctagcgcagcagcagcgtgaagtccggcacagcctctgtcgtgtgcctgctgaacaac
161    P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N
541    ttctacccccgcgaggccaaggtgcagtggaaggtggacaatgcctgcagagcggcaac
181    F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N
601    agccaggaagcgtgaccgagcaggacagcaaggactccacctacagcctgagcagcacc
201    S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T
661    ctgaccctgagcaaggccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgccaagtgaccac
221    L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H
721    cagggcctgtctagccccgtgaccaagagcttcaaccggggcgagtgccctcgagcaggtg
241    Q G L S S P V T K S F N R G E C L E Q V
781    cagctggtggaatctggcggcggagtggtgagcctggcagaagcctgagactgagctgt
261    Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L S C
```

841 gccgccagcggcttcaccttcagcagctacatcatgcactgggtgcgccaggcccctggc
 281 A A S G F T F S S Y I M H W V R Q A P G
 901 aagggactggaatgggtggccgtgatcagctacgacggccggaacaagtactacgccgac
 301 K G L E W V A V I S Y D G R N K Y Y A D
 961 agcgtgaagggccgggttcaccatctcccgggacaacagcaagaacaccctgtacctgcag
 321 S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q
 1021 atgaacagcctgcggggccgaggacaccgcccgtgtactactgtgcccagagacaccgacggc
 341 M N S L R A E D T A V Y Y C A R D T D G
 1081 tacgacttcgactattggggccagggcaccctcgtgaccgtgtctagcggaggcggagga
 361 Y D F D Y W G Q G T L V T V S S G G G G
 1141 tctggcggaggggggatcaggcgggggaggctctgaaatcgtgctgacacagagccccgcc
 381 S G G G G S G G G G S E I V L T Q S P A
 1201 accctgtcactgtctccaggcgaagagccaccctgagctgcagagccagccagagcgtg
 401 T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V
 1261 tccagctacctggcctgggtatcagcagaagcccggacaggccccagactgctgatctac
 421 S S Y L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y
 1321 gacgccagcaatcggggccacaggcatccctgccagatccccggctctggcagcggcacc
 441 D A S N R A T G I P A R F S G S G S G T
 1381 gacttcaccctgacaatcagcagcctggaacccgaggactttgccgtgtattattgccag
 461 D F T L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q
 1441 cagcggaccaactggcccctgacctttggcggaggcaccaaggtggaaatcaaggccagc
 481 Q R T N W P L T F G G G T K V E I K A S
 1501 accaagggctaa
 501 T K G -

anti-CD40-C-Flag-VH-N297A-scFv:anti-CD70(2H5)-pCR3

1 atgaacttcggcttcagcctgatcttctcctgggtgctgggtgctgaagggcgtgcagtgcgaa
 1 M N F G F S L I F L V L V L K G V Q C E
 61 gtgaagctgggtgccccggcaattggactacaaggacgacgacgacaaagaattccagggtg
 21 V K L V P R Q L D Y K D D D D K E F Q V
 121 cagctgggtcagctctggcgcgcaagtgaaaaagcctggcgcctctgtgaaggtgtcctgt
 41 Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C
 181 acagccagcggcttcaacatcaaggactactacgtgcactgggtcaagcaggcccctgga
 61 T A S G F N I K D Y Y V H W V K Q A P G
 241 caaggactggaatggatgggcagaatcgacccccgaggacggcgactctaagtacgccct
 81 Q G L E W M G R I D P E D G D S K Y A P

301 aagttccagggcaaagccaccatgaccgccgataaccagcacaagcaccgtgtacatggaa
101 K F Q G K A T M T A D T S T S T V Y M E
361 ctgagcagcctgagaagcgaggacaccgccgtgtactactgcaccaccagctactatgtg
121 L S S L R S E D T A V Y Y C T T S Y Y V
421 ggcacctacggctattggggccagggcacactggtcaccgtgtccagcagatccagcagc
141 G T Y G Y W G Q G T L V T V S S R S S S
481 gcctctacaaagggccccagcgtgttccctctggcccctagcagcaagagcacatctggc
161 A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G
541 ggaacagccgccctgggctgcctcgtgaaggactactttcccagcccgtgaccgtgtcc
181 G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S
601 tggaaactctggcgctctgacaagcggcgtgcacacctttccagccgtgctgcagagcagc
201 W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S
661 ggctgtactctctgagcagcgtcgtgacagtgccagcagctctctgggaccagacc
221 G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T
721 tacatctgcaacgtgaaccacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaggtggaacc
241 Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P
781 aagagctgcgccaaagaccacacctgtcccccttgtcctgccccgaactgctgggaggg
261 K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G
841 ccttccgtgttctgttccccccaaagcccaaggacaccctgatgatcagccggaccccc
281 P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P
901 gaagtgacctgctggtggtggatgtgtcccacgaggaccctgaagtgaagttaattgg
301 E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W
961 tacgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaaagaccaagcctagagaggaacagtacgcc
321 Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y A
1021 agcacctaccgggtggtgtccgtgctgacagtgtgcaccaggactggctgaacggcaaa
341 S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K
1081 gagtacaagtgcagggtgtccaacaaggccctgcctgccccatcgagaaaaccatcagc
361 E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S
1141 aaggccaagggccagccccgcgaaccccaggtgtacacactgcccccaagcagggacgag
381 K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E
1201 ctgaccaagaaccaggtgtccctgacctgtctcgtgaaaggcttctaccccagcgatatc
401 L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I
1261 gccgtggaatgggagagcaacggccagccccgagaacaactacaagaccacccccctgtg
421 A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V
1321 ctggacagcgcagcgtcattcttctgtacagcaagctgaccgtggacaagtcccgggtgg
441 L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W
1381 cagcagggcaacgtgttcagctgcagcgtgatgcacgaggccctgcacaaccactacacc
461 Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T
1441 cagaagtccctgagcctgagccccggcaagctcgagcaggtgcagctggtggaatctggc
481 Q K S L S L S P G K L E Q V Q L V E S G
1501 ggcggagtggcgcagcctggcagaagcctgagactgagctgtgccgccagcggcttcacc
501 G G V V Q P G R S L R L S C A A S G F T
1561 ttcagcagctacatcatgcaactgggtgcgccagggcccctggcaagggactggaatgggtg
521 F S S Y I M H W V R Q A P G K G L E W V

1621 gccgtgatcagctacgacggccggaacaagtactacgccgacagcgtgaagggccggttc
 541 A V I S Y D G R N K Y Y A D S V K G R F
 1681 accatctcccgggacaacagcaagaacaccctgtacctgcagatgaacagcctgcgggcc
 561 T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A
 1741 gaggacaccgccgtgtactactgtgccagagacaccgacggctacgacttcgactattgg
 581 E D T A V Y Y C A R D T D G Y D F D Y W
 1801 ggccagggcaccctcgtgaccgtgtctagcggaggcggaggatctggcggaggggatca
 601 G Q G T L V T V S S G G G G S G G G G S
 1861 ggcgggggaggctctgaaatcgtgctgacacagagccccgccaccctgtcactgtctcca
 621 G G G G S E I V L T Q S P A T L S L S P
 1921 ggcgaaagagccaccctgagctgcagagccagccagagcgtgtccagctacctggcctgg
 641 G E R A T L S C R A S Q S V S S Y L A W
 1981 tatcagcagaagccccggacagggccccagactgctgatctacgacgccagcaatcgggcc
 661 Y Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R A
 2041 acaggcatccctgccagatthttccggctctggcagcggcaccgacttcaccctgacaatc
 681 T G I P A R F S G S G S G T D F T L T I
 2101 agcagcctggaacccgaggactttgccgtgtattattgccagcagcggaccaactggccc
 701 S S L E P E D F A V Y Y C Q Q R T N W P
 2161 ctgacctttggcggaggcaccaaggtggaatcaaggccagcaccaagggctaa
 721 L T F G G G T K V E I K A S T K G -

anti-CD40-C-Flag-VL-scFv:anti-BCMA(C11D53)-pCR3

1 atgaacttcggcttcagcctgatcttccctgggtgctggtgctgaagggcgtgcagtgcgaa
 1 M N F G F S L I F L V L V L K G V Q C E
 61 gtgaagctggtgccccggcaattggactacaaggacgacgacgacaaagaattggacatc
 21 V K L V P R Q L D Y K D D D D K E L D I
 121 cagatgacacagagccccagcagcctgtctgccagcgtgggagatagagtgaccatcacc
 41 Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T
 181 tgtagcggcagcagcagcgtgtcctacatgctgtggttccagcagaagcctggcaaggcc
 61 C S A S S S V S Y M L W F Q Q K P G K A
 241 cctaagctgctgatctacagcactccaatctggccagcggcgtgccaagcagatthttct
 81 P K L L I Y S T S N L A S G V P S R F S
 301 ggctctggcagcggcaccgacttcaccctgaccatattctagcctgcagccagaggacttc
 101 G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F
 361 gccacctactactgccagcagcggacattctaccctacacctttggcggaggcaccaag
 121 A T Y Y C Q Q R T F Y P Y T F G G G T K
 421 gtggaatcaagggatccgaaatcaagcgtacggtggccgctccagcgtgttcatcttc
 141 V E I K G S E I K R T V A A P S V F I F

481 ccacctagcgcgagcagctgaagtccggcacagcctctgtcgtgtgcctgctgaacaac
161 P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N
541 ttctacccccgcgaggccaaggtgcagtggaaggtggacaatgccctgcagagcggcaac
181 F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N
601 agccaggaaagcgtgaccgagcaggacagcaaggactccacctacagcctgagcagcacc
201 S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T
661 ctgaccctgagcaaggccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgcgaagtgaccac
221 L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H
721 cagggcctgtctagccccgtgaccaagagcttcaaccggggcgagtgcctcgaggatc
241 Q G L S S P V T K S F N R G E C L E D I
781 gtgctgaccagagccctgcccagcctggccatgtctctggaagagagccaccatcagc
261 V L T Q S P A S L A M S L G K R A T I S
841 tgcagagccagcgcgagagcgtgtccgtgattggcgcccacctgatccactggtatcagcag
281 C R A S E S V S V I G A H L I H W Y Q Q
901 aagcccggccagcccccaagctgctgatctacctggccagcaacctggaaaccggcgtg
301 K P G Q P P K L L I Y L A S N L E T G V
961 cccgccagatTTTTctggcagcggcagcgggaaccgacttcaccctgaccatcgaccccgtg
321 P A R F S G S G S G T D F T L T I D P V
1021 gaagaggacgacgtggccatctacagctgcctgcagagcagaatcttccccggaccttt
341 E E D D V A I Y S C L Q S R I F P R T F
1081 ggcgaggccaccaagctggaaatcaagggcagcaccagcggctccggcaagcctggatct
361 G G G T K L E I K G S T S G S G K P G S
1141 ggcgagggatctaccaagggacagatccagctggtgcagagcggccctgagctgaagaaa
381 G E G S T K G Q I Q L V Q S G P E L K K
1201 cccggcgagacagtgaaatctcctgcaagggccagcggctacaccttcaccgactacagc
401 P G E T V K I S C K A S G Y T F T D Y S
1261 atcaactgggtcaagagggccctggcaagggcctgaagtggatgggctggatcaacacc
421 I N W V K R A P G K G L K W M G W I N T
1321 gaaaccagagagcccgcctacgcctacgacttcagagggcagattcgccttcagcctggaa
441 E T R E P A Y A Y D F R G R F A F S L E
1381 acaagcgcctccaccgcctacctgcagatcaacaacctgaagtacgaggacaccgccacc
461 T S A S T A Y L Q I N N L K Y E D T A T
1441 tacttttgcgcctggactacagctacgccatggactattggggccagggcaccagcgtg
481 Y F C A L D Y S Y A M D Y W G Q G T S V
1501 accgtgtccagctaa
501 T V S S -

441 L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W
1381 cagcagggcaacgtgttcagctgcagcgtgatgcacgagccctgcacaaccactacacc
461 Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T
1441 cagaagtccctgagcctgagccccggcaagctcgaggatatcgtgctgaccagagccct
481 Q K S L S L S P G K L E D I V L T Q S E
1501 gccagcctggccatgtctctctgggcaagagagccaccatcagctgcagagccagcgagagc
501 A S L A M S L G K R A T I S C R A S E S
1561 gtgtccgtgattggcgcccacctgatccactggtatcagcagaagccccggccagcccccc
521 V S V I G A H L I H W Y Q Q K P G Q P E
1621 aagctgctgatctacctggccagcaacctggaaccggcgtgcccgccagattttctggc
541 K L L I Y L A S N L E T G V P A R F S G
1681 agcggcagcgggaaccgacttcaccctgaccatcgacccccgtggaagaggacgacgtggcc
561 S G S G T D F T L T I D P V E E D D V A
1741 atctacagctgacctgcagagcagaatcttccccggacctttggcggaggcaccaagctg
581 I Y S C L Q S R I F P R T F G G G T K L
1801 gaaatcaagggcagcaccagcggctccggcaagcctggatctggcgagggatctaccaag
601 E I K G S T S G S G K P G S G E G S T K
1861 ggacagatccagctggtgcagagcggccctgagctgaagaaaccggcgagacagtgaag
621 G Q I Q L V Q S G P E L K K P G E T V K
1921 atctcctgcaaggccagcggctacaccttcaccgactacagcatcaactgggtcaagagg
641 I S C K A S G Y T F T D Y S I N W V K R
1981 gccctggcaagggcctgaagtggatgggctggatcaacaccgaaaccagagagcccgcc
661 A P G K G L K W M G W I N T E T R E P A
2041 tacgcctacgacttcagagggcagattcgccttcagcctggaaacaagcgcctccaccgcc
681 Y A Y D F R G R F A F S L E T S A S T A
2101 tacctgcagatcaacaacctgaagtacgaggacaccgccacctaacttttgcgccctggac
701 Y L Q I N N L K Y E D T A T Y F C A L D
2161 tacagctacgccatggactattggggccagggcaccagcgtgaccgtgtccagctaa
721 Y S Y A M D Y W G Q G T S V T V S S -

anti-CD40-C-Flag-VL-light-scFv:anti-PDL1(Avelumab)-pCR3

1 atgaacttcggcttcagcctgatcttcctcctggctgctggtgctgaaggcgctgcagtgcgaa
1 M N F G F S L I F L V L V L K G V Q C E
61 gtgaagctggtgccccggcaattggactacaaggacgacgacgacaaaagaattggacatc
21 V K L V P R Q L **D Y K D D D D K** E L **D I**
121 cagatgacacagagccccagcagcctgtctgcccagcgtgggagatagagtgaccatcacc
41 **Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T**
181 tgtagcggcagcagcagcgtgtcctacatgctgtggttccagcagaagcctggcaaggcc
61 **C S A S S S V S Y M L W F Q Q K P G K A**
241 cctaagctgctgatctacagcacctccaatctggccagcggcgtgccaagcagattttct
81 **P K L L I Y S T S N L A S G V P S R F S**
301 ggctctggcagcggcaccgacttcaccctgaccatatactagcctgcagccagaggacttc
101 **G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F**
361 gccacctactactgcccagcagcggacattctaccctacacctttggcggaggcaccaag
121 **A T Y Y C Q Q R T F Y P Y T F G G G T K**
421 gtggaaatcaagggatccgaaatcaagcgtacggtggccgctcccagcgtgttcattcttc
141 **V E I K G S E I K R T V A A P S V F I F**
481 ccacctagcagcagcagcgtgaagtccggcacagcctctgtcgtgtgctgctgaacaac
161 **P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N**
541 ttctacccccgcgaggccaaggtgcagtggaaggtggacaatgcctgcagagcggcaac
181 **F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N**
601 agccaggaaagcgtgaccgagcaggacagcaaggactccacctacagcctgagcagcacc
201 **S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T**
661 ctgaccctgagcaaggccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgccaagtgaccac
221 **L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H**
721 cagggcctgtctagccccgtgaccaagagcttcaaccggggcgagtgctcgaggagtg
241 **Q G L S S P V T K S F N R G E C L E E V**
781 cagctgctggaatctggcggaggacttgttcagcctggcggctctctgagactgtcttgt
261 **Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C**
841 gccgccagcggcttcaccttcagcagctatatcatgatgtgggtccgacagggcccctggc
281 **A A S G F T F S S Y I M M W V R Q A P G**
901 aaaggccttgaatgggtgtccagcatctatcccagcggcggcatcaccttttacgccgac
301 **K G L E W V S S I Y P S G G I T F Y A D**
961 acagtgaagggcagattcaccatcagccgggacaacagcaagaacaccctgtacctgcag
321 **T V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q**
1021 atgaacagcctgagagccgaggacaccgccgtgtactactgcgccagaatcaagctgggc
341 **M N S L R A E D T A V Y Y C A R I K L G**
1081 accgtgaccaccgtggattattggggacagggcaccctggtcaccgtgtcctccagatct
361 **T V T T V D Y W G Q G T L V T V S S R S**
1141 tctacaaagggccccaagctggaagagggcgagtttagcgaagcccaattgcagagcgcc
381 **S T K G P K L E E G E F S E A Q L Q S A**

1201 ctgacacagcctgcatccgtgtctggatctccaggccagagcatcaccatctcttgtagc
401 L T Q P A S V S G S P G Q S I T I S C T
1261 ggcacaagctccgatgtcggcggctacaattacgtgtcctggatcagcagcaccgccg
421 G T S S D V G G Y N Y V S W Y Q Q H P G
1321 aaggcccctaagctgatgatctacgacgtgtccaacagaccctccggcgtgtccaataga
441 K A P K L M I Y D V S N R P S G V S N R
1381 ttcagcggcagcaagagcggcaacaccgccagcctgacaattagcggactgcaggccgag
461 F S G S K S G N T A S L T I S G L Q A E
1441 gacgaggccgattactactgttagcagctacaccagctcctccaccagagtgtttggcacc
481 D E A D Y Y C S S Y T S S S T R V F G T
1501 ggcaccaaagtgaccgtgctttaa
501 G T K V T V L -

V. Danksagung

Besonderer Dank gilt Herrn Professor Wajant, der mir die Möglichkeit gab, in seiner Abteilung für Molekulare Innere Medizin diese Promotionsarbeit durchzuführen. Für Fragen zur Problemlösung stand er jederzeit zur Verfügung. Weiterhin konnte ich jederzeit auf seine uneingeschränkte Unterstützung zählen, wofür ich ihm hiermit noch einmal explizit danken möchte.

Ebenso möchte ich Herrn Professor Otto einen großen Dank für die Zweitbegutachtung aussprechen.

Weiterhin möchte ich mich ganz herzlich bei allen Mitarbeitern der Abteilung bedanken. Sie standen mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite und jeder leistete seinen Beitrag für eine angenehme Arbeitsatmosphäre, in der man sich gut aufgenommen fühlte und dementsprechend konzentriert und effektiv arbeiten konnte. Besonders hervorheben möchte ich Johannes Nelke, der mir während der Durchführung der Labortätigkeit und auch während der schriftlichen Arbeit zur Seite stand und trotz seines Arbeitsortwechsels weiterhin zum Gelingen dieser Promotionsarbeit beitrug. Weiterhin möchte ich Dr. Juliane Medler danken, die mich während der Labortätigkeit ebenfalls jederzeit tatkräftig unterstützte.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Eltern Ursula und Matthias, bei meinem Bruder Philipp und bei meiner Freundin Caroline bedanken, die mir während der Durchführung dieser Arbeit und darüber hinaus immer zur Seite stehen.

VI. Lebenslauf

(Aus datenschutzrechtlichen Gründen in der Online-Fassung hier nicht abgebildet)