



**Entwicklung und Charakterisierung von  
*Gaussia princeps* Luziferase-Antikörper-Fusionsproteinen**

Development and characterization of *Gaussia princeps*  
luciferase antibody fusion proteins

Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

**Juliane Kums**

geb. 13.08.1988 in Freiberg

Würzburg, 2017

**Eingereicht am:** .....

**Mitglieder der Promotionskommission:**

Vorsitzender: .....

Gutachter: Prof. Dr. Harald Wajant

Gutachter: Prof. Dr. Thomas Müller

**Tag des Promotionskolloquiums:** .....

**Doktorurkunde ausgehändigt am:** .....

---

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation: „**Entwicklung und Charakterisierung von *Gaussia princeps* Luziferase-Antikörper-Fusionsproteinen**“, 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.

Würzburg, .....

Datum

Unterschrift

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 01. Dezember 2013 bis 31. Dezember 2016 an der Medizinischen Klinik und Poliklinik II in der Abteilung für Molekulare Innere Medizin des Universitätsklinikums Würzburg unter der Anleitung von Prof. Dr. Harald Wajant angefertigt.

---

## Zusammenfassung

Antikörper, die Oberflächenantigene erkennen, sind sowohl in der Diagnostik als auch in der Therapie verschiedener Erkrankungen von enormer Bedeutung. Damit Antikörper in diesen Bereichen eingesetzt werden können, ist es sehr wichtig, dass die Interaktion eines Antikörpers oder auch eines Antikörperkonjugats mit seinem Antigen oder Fc-Rezeptoren ausreichend charakterisiert wird. Hierfür werden meist zellfreie Verfahren angewandt, wie die isotherme Titrationskalorimetrie oder die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie. Diese unterliegen verschiedenen Limitationen, beispielsweise der Verfügbarkeit von rekombinantem Antigen. Vor allem aber werden zelluläre Einflüsse, die die Bindungseigenschaften der Antikörper beeinflussen, nicht berücksichtigt. Aber auch die derzeit angewandten Verfahren für zelluläre Bindungsstudien können problematisch sein, da sie meist auf Antikörpern basieren, die biochemisch markiert worden sind, was zu funktionellen Beeinträchtigungen führen kann. Außerdem zeigen solche Antikörper häufig keine einheitliche Stöchiometrie der jeweiligen Reporterstoffe und die Reproduzierbarkeit des Markierungsverfahrens ist in den meisten Fällen nicht gewährleistet. Positionsspezifische Markierungen sind jedoch vergleichsweise sehr aufwendig.

Um die genannten Probleme zu umgehen, wurden in der vorliegenden Arbeit am Beispiel des Fn14-spezifischen Antikörpers 18D1 Antikörper-Fusionsproteine hergestellt und charakterisiert, die an verschiedenen Positionen genetisch mit der *Gaussia princeps* Luziferase (GpL) fusioniert worden sind. Dabei zeigte sich, dass die Positionierung der Luziferase am C-Terminus der leichten Kette des Antikörpers (GpL<sub>(CT-LC)</sub>) die Bindungseigenschaften der GpL-18D1-IgG1-Fusionsproteine an Fn14 und an die verschiedenen Fcγ-Rezeptoren (FcγR) nicht oder nur in geringem Umfang beeinflusst. Auch die agonistische Aktivität der GpL-18D1-IgG1-Fusionsproteine, welche abhängig ist von der Oligomerisierung über Protein G oder der FcγR-Bindung, wurde durch die GpL-Markierung nicht wesentlich beeinflusst. Diese Ergebnisse ließen sich am Beispiel von 18D1 ebenfalls auf die dimeren Antikörper-Isotypen IgG2, mIgG1 und mIgG2A übertragen. GpL-Fusionsproteine der Antikörper E09-IgG1 (CD95-spezifisch), G28.5-IgG1 (CD40-spezifisch) und BHA10-IgG1 (LTβR-spezifisch) zeigten gleichfalls keine gravierenden Veränderungen der Bindungseigenschaften oder den funktionellen Eigenschaften, was für eine breite Anwendbarkeit von GpL-Antikörper-Fusionsproteinen spricht.

---

Zusammenfassend betrachtet zeigen die hier präsentierten Ergebnisse, dass die genetische Fusion der *Gaussia princeps* Luziferase an das C-terminale Ende der leichten Antikörperkette eine sehr gute Möglichkeit darstellt, Antigen-Antikörper-Interaktionen zu charakterisieren ohne dabei mit den Eigenschaften des Antikörpers zu interferieren. Dabei besticht dieser Ansatz im Vergleich zu anderen gängigen Verfahren durch seine Reproduzierbarkeit, eine einfache Handhabung, geringe Kosten und eine extrem hohe Sensitivität. Außerdem könnte dieses Antikörper-Fusionsproteinformat zukünftig auch in vielen Bereichen als Tracer eingesetzt werden mit dem Vorteil, dass keinerlei Radioaktivität benötigt werden würde.

---

## Summary

Antibodies raised against surface proteins are of enormous importance for diagnosis and therapy of various diseases. In the development of antibodies for these areas there is a high need for detailed characterization of the interactions of an antibody/antibody-conjugate with its antigen and Fc-receptors. Currently this binding properties are mostly evaluated by cell free assays like surface plasmon resonance and isothermal titration calorimetry. These methods have principle limitations, for example the need of recombinantly produced antigens and the fact that cellular factors which can influence the antigen-antibody interaction cannot be considered. However, the presently used methods for binding studies with intact cells have various limitations, too, e.g. the need for labeled antibodies. Biochemical labeling can influence the binding properties of the antibody and also its functional characteristics. Additionally the resulting antibody-populations can be heterogeneous relating to the amount of biochemical-labeling and the position of the labeling. Also the labeling procedure is not very reproducible. Side specific labeling methods on the other side are typically quite elaborate.

To overcome these limitations, on the example of the Fn14-specific antibody 18D1-IgG1 antibody fusion protein formats were investigated which were genetically fused with the *Gaussia princeps* luciferase (GpL) at different sites of the antibody. Binding studies with these variants showed, that the C-terminus of the antibody light chain (e.g. with GpL, GpL<sub>(CT-LC)</sub>) is the best suited position for genetic antibody labeling, because GpL domain tagging to this position did not or only very weakly influence the binding properties of the antibody to Fn14 and the Fc $\gamma$ -receptors. Moreover, the agonistic activity of the antibody which requires oligomerization through protein G or Fc $\gamma$ -receptor binding for full appearance was not affected. Similar results were obtained for the dimeric 18D1 isotypes IgG2, mIgG1 and mIgG2A. Furthermore, GpL fusion proteins of the antibodies E09-IgG1 (CD95-specific), G28.5-IgG1 (CD40-specific) und BHA10-IgG1 (LT $\beta$ R-specific) showed no big differences neither in their binding properties to their antigen and Fc $\gamma$ -receptors nor with respect to their functional activities, indicating a broad applicability of GpL antibody fusion proteins.

Summing up, the herein presented results reveal that C-terminal GpL-tagging of the antibody light chain is a versatile tool to characterize the binding properties of an antibody to its antigen without influencing the original properties of the antibody. The GpL antibody fusion proteins of this type are very easily manageable, show a high reproducibility, are cost-efficient and

---

allow very sensitive cellular binding studies and could be used as tracer molecules in the future.

---

# **Inhaltsverzeichnis**

<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG</b>	<b>III</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>IV</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>VI</b>
<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>VIII</b>
<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Antikörper</b>	<b>1</b>
1.1.1 Struktur von IgG-Antikörpern	1
1.1.2 Antikörper in der Diagnostik und Therapie	4
1.1.3 Charakterisierung von Antigen-Antikörper-Bindungen	7
1.1.4 Antikörper-induzierte Signaltransduktion	9
<b>1.2 Das TWEAK – Fn14 System</b>	<b>15</b>
1.2.1 Struktur und Expression von TWEAK und Fn14	16
1.2.2 Fn14-induzierte Signalwege	18
1.2.3 TWEAK und Fn14 als therapeutische Ziele	23
<b>1.3 Zielsetzung dieser Arbeit</b>	<b>24</b>
<b>2. MATERIALIEN</b>	<b>25</b>
<b>2.1 Chemikalien, Reagenzien und Zellkulturmedien</b>	<b>25</b>
<b>2.2 Enzyme</b>	<b>26</b>
<b>2.3 Antikörper</b>	<b>26</b>
<b>2.4 Kommerzielle Kits</b>	<b>27</b>
<b>2.5 Geräte, Verbrauchs- und Labormaterial</b>	<b>27</b>
<b>2.6 Lösungen und Puffer</b>	<b>29</b>
<b>2.7 Verwendete Zelllinien</b>	<b>31</b>
<b>2.8 Plasmide und rekombinante Fusionsproteine</b>	<b>31</b>
<b>3. METHODEN</b>	<b>34</b>
<b>3.1 Klonierung der leichten Antikörperketten für murine 18D1-Fusionsproteine</b>	<b>34</b>
<b>3.2 Zellkultur</b>	<b>35</b>



<b>3.3 Produktion und Reinigung der Antikörper-Fusionsproteine</b>	<b>35</b>
3.3.1 Produktion	35
3.3.2 Anti-FLAG-Affinitätschromatographie	36
<b>3.4 Western Blot</b>	<b>36</b>
3.4.1 SDS-PAGE	36
3.4.2 Elektrottransfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran	37
3.4.3 Immundetektion	37
<b>3.5 Silberfärbung</b>	<b>37</b>
<b>3.6 Gelfiltration (Größenausschlusschromatographie)</b>	<b>37</b>
<b>3.7 Durchflusszytometrie</b>	<b>38</b>
<b>3.8 <i>Gaussia princeps</i> Luziferaseassays</b>	<b>38</b>
3.8.1 Gleichgewichtsbindungsstudien (Bestimmung der $K_D$ )	38
3.8.2 Homologe Kompetitionsexperimente (Bestimmung der $K_i$ )	40
3.8.3 Bestimmung der Rezeptoren pro Zelle	40
<b>3.9 IL8 ELISA</b>	<b>41</b>
<b>3.10 Zytotoxizitätsassay</b>	<b>41</b>
<b>4. ERGEBNISSE</b>	<b>43</b>
<b>4.1 Charakterisierung von GpL-18D1-IgG1-Fusionsproteinen</b>	<b>43</b>
4.1.1 Konstruktion und Reinigung der 18D1-IgG1-Fusionsproteinen	43
4.1.2 Affinität der GpL-18D1-IgG1-Fusionsproteine für Fn14	44
4.1.3 Vergleich der genetischen Fusion von GpL und Citrin an 18D1-IgG1	47
4.1.4 Affinität der GpL-18D1-IgG1-Fusionsproteine für Fc $\gamma$ -Rezeptoren	48
4.1.5 GpL-Fusionierung an 18D1-IgG1 hat keinen Einfluss auf die agonistische Aktivität der Antikörper nach Oligomerisierung oder Fc $\gamma$ R-Bindung	52
<b>4.2 Charakterisierung verschiedener GpL<sub>(CT-LC)</sub>-18D1-Isotyp-Varianten</b>	<b>55</b>
4.2.1 Reinigung und Gelfiltration der GpL <sub>(CT-LC)</sub> -18D1-Isotyp-Varianten	55
4.2.2 Affinität der neuen GpL <sub>(CT-LC)</sub> -18D1-Isotypen für Fn14 und Fc $\gamma$ -Rezeptoren	56
4.2.3 Agonistische Aktivität der 18D1-Isotyp-Varianten in Abhängigkeit von Fc $\gamma$ R-Bindung	61
<b>4.3. GpL-Markierung zur Charakterisierung von Antikörpern ist auch für andere TNFRSF-Rezeptor-spezifische Antikörper geeignet</b>	<b>64</b>
4.3.1 Affinitätsbestimmung der untersuchten CD95-, LT $\beta$ R- und CD40- spezifischen Antikörper für ihre jeweiligen Antigene	65
4.3.2 Die Aktivität der CD95-, LT $\beta$ R- und CD40- spezifischen Antikörper wird durch die GpL-Markierung nicht beeinflusst	67
<b>5. DISKUSSION</b>	<b>70</b>
<b>5.1 Vorteile und Nachteile der genetischen Fusion der <i>Gaussia princeps</i> Luziferase an Antikörper</b>	<b>70</b>
<b>5.2 Vergleich der GpL-Markierung mit alternativen, positionsspezifischen Markierungstechniken</b>	<b>74</b>
	IX

---

<b>5.3 GpL-markierte Antikörper als Tracer</b>	<b>76</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>79</b>
<b>7. ANHANG</b>	<b>89</b>
7.1 Sequenzen	89
7.2 Abkürzungsverzeichnis	91
<b>PUBLIKATIONEN</b>	<b>XI</b>
<b>DANKSAGUNG</b>	<b>XII</b>

# **1. Einleitung**

## **1.1 Antikörper**

Antikörper sind Glykoproteine, die einen wichtigen Teil der adaptiven Immunantwort von Wirbeltieren darstellen und dabei hochspezifisch körperfremde Strukturen, sogenannte Antigene, erkennen, die insbesondere von Bakterien, Viren oder anderen Pathogenen stammen können. Bei Autoimmunerkrankungen werden körpereigene Antigene fälschlicherweise als fremd erkannt. Antigene bestehen aus mehreren Epitopen, die wiederum spezifisch von verschiedenen Antikörpern gebunden werden können (Kaufmann, 2014).

Antikörper werden als Rezeptoren auf der Zelloberfläche von im Blut zirkulierenden B-Lymphozyten exprimiert. Ein Kontakt mit dem spezifischen Antigen regt die entsprechenden B-Lymphozyten zur Teilung an und sie beginnen Antikörper in großen Mengen zu sezernieren. Durch die Bindung an Antigen-tragende Pathogene werden diese für phagozytische, zytotoxische oder lytische Prozesse der Immunabwehr markiert (Mulisch, 2013).

Neben dieser fundamentalen Rolle im Rahmen einer Immunantwort sind Antikörper in den letzten Jahren immer mehr im Bereich von Therapie und Diagnostik in den Vordergrund gerückt, wie auch in der Grundlagenforschung.

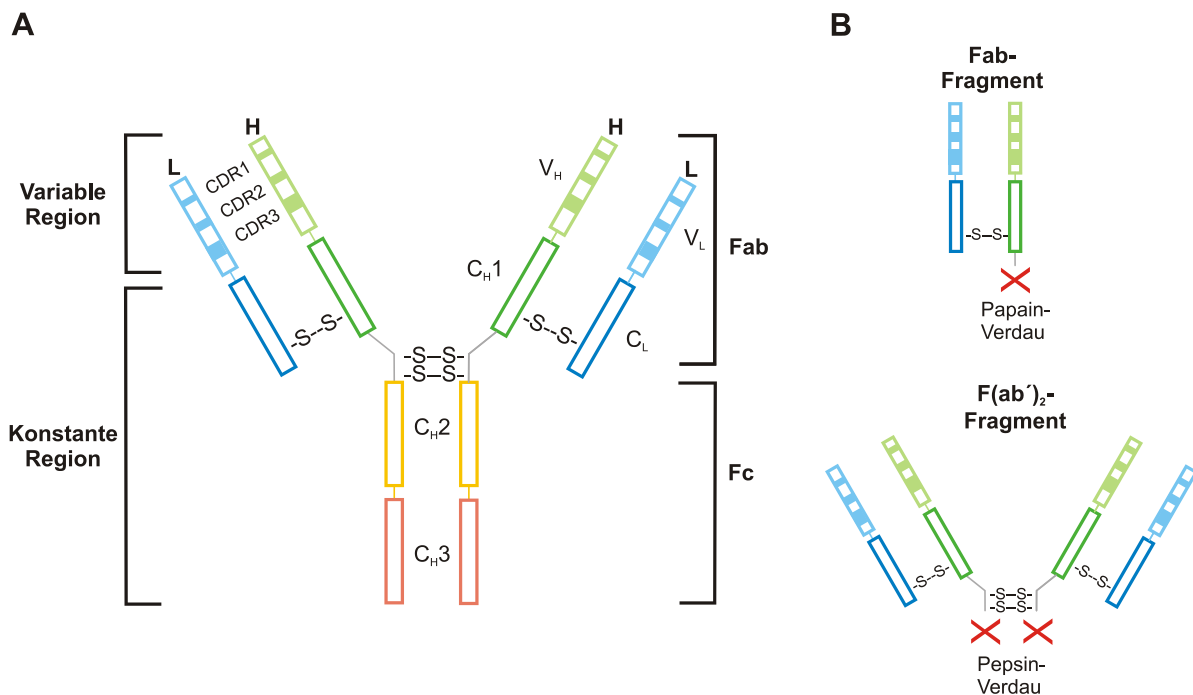
### **1.1.1 Struktur von IgG-Antikörpern**

Antikörper lassen sich beim Menschen in fünf verschiedene Immunglobulin-Klassen (IgA, IgD, IgE, IgG und IgM) einteilen, die zu 82-96 % aus Proteinen bestehen und zu 4-18 % aus Kohlenhydraten (Schur, 1988). IgG-Antikörper bilden mit 10-20 % der menschlichen Plasmaproteine und ca. 80 % der gesamten Immunglobuline die größte Gruppe. Bei einer neuen Infektion werden IgG-Antikörper erst nach ca. drei Wochen gebildet. Kommt es aber zu einer erneuten Infektion mit demselben Erreger, können sie dank des immunologischen Gedächtnisses sehr schnell und in großen Mengen produziert werden, um einen neuerlichen Ausbruch der Infektion zu verhindern. Des Weiteren sind IgG-Antikörper in der Lage, während einer Schwangerschaft die Plazenta zu durchdringen. So kann ein Kind vor und nach der Geburt über das Immunsystem der Mutter geschützt werden (Vidarsson et al., 2014). In der Therapie und Diagnostik finden am häufigsten IgG-Antikörper Verwendung, aufgrund ihres

vergleichsweise geringen Molekulargewichts von ca. 150 kDa, einer relativ einfachen Produktion und vor allem wegen ihrer stark ausgeprägten Effektor-Funktionen im Rahmen einer Immunantwort (Liu et al., 2008).

Strukturell weisen alle IgG-Antikörper eine Y-Form auf und bestehen aus insgesamt vier Polypeptidketten (~150 kDa): zwei identische schwere H-Ketten (HC, *heavy chain*; ~50 kDa) und zwei identische leichte L-Ketten (LC, *light chain*; ~25 kDa) (Elgert, 2009). Die H-Ketten von IgG-Antikörpern sowie auch von IgA- und IgE-Antikörpern besitzen in ihrem Aufbau drei konstante Regionen (*constant heavy*; C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub> und C<sub>H3</sub>) und eine variable Region (*variable heavy*; V<sub>H</sub>). Die L-Ketten weisen nur eine konstante (*constant light*; C<sub>L</sub>) und eine variable Domäne (*variable light*; V<sub>L</sub>) auf. Die einzelnen Polypeptidketten eines Antikörpers werden über Disulfidbrücken miteinander verbunden. Die Disulfidbrücken zur Verknüpfung der H-Ketten befinden sich in der ca. 15 Aminosäuren umfassenden Gelenkregion (*hinge*-Region) oberhalb von C<sub>H2</sub>, die Disulfidbrücken zur Verknüpfung der H- und L-Ketten im Bereich der C<sub>H1</sub>- und C<sub>L</sub>-Region (Abb. 1-A). IgG-Antikörper lassen sich in die Isotypen IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4 unterteilen, die hoch konserviert sind, sich jedoch in der Länge der *hinge*-Region und dem oberen Teil der C<sub>H2</sub>-Domäne unterscheiden, sowie in der Anzahl an Disulfidbrücken. Die Einteilung ist historisch bedingt und beschreibt die prozentuale Menge der jeweiligen Isotypen im Serum (Jefferis and Kumararatne, 1990; Liu and May, 2012; Roux et al., 1997; Schroeder and Cavacini, 2010).

Die Antigenbindung erfolgt über die N-terminalen Arme der Y-förmigen IgG-Antikörper, den bereits erwähnten variablen Domänen der schweren und leichten Ketten. Jeder Arm kann dabei ein Antigen binden. Die Spezifität für ein bestimmtes Antigen wird durch je drei hypervariable Regionen der variablen Domänen determiniert, den CDRs (*complementarity determining regions*) (Sesarman et al., 2010). Eine enorme Sequenzvarianz der CDRs ermöglicht es, dass Wirbeltiere nahezu alle pathogenen Antigene erkennen können. Der Mechanismus, der dieser Sequenzvarianz zugrunde liegt, ist die V(D)J-Rekombination (Murphy et al., 2009; Potter, 1983).



**Abbildung 1: Struktur von IgG-Antikörpern**

**(A)** Schematische Darstellung von humanen IgG-Antikörpern am Beispiel von IgG1 bestehend aus je zwei identischen schweren (H) und leichten (L) Ketten. Die Antigenbindung erfolgt über die variablen Regionen der schweren und leichten Ketten ( $V_H$  und  $V_L$ ). **(B)** Durch einen proteolytischen Verdau mit dem Enzym Papain bzw. Pepsin entstehen das Fab- bzw.  $F(ab')_2$ -Fragment.  $C_{H1-3}$ = konstante Region der H-Kette;  $C_L$ = konstante Region der L-Kette; -S-S= Disulfidbrücke; CDR= *complementarity determining region*; Fab= *fragment antigen binding*; Fc= *fragment crystallisable*.

Die variablen Domänen eines Antikörpers bilden zusammen mit dem konstanten Teil der L-Kette und der  $C_{H1}$ -Region der H-Kette ein Fab-Fragment (*fragment antigen binding*) (Abb. 1-A). Durch einen proteolytischen Verdau mit dem Enzym Papain werden die beiden Fab-Fragmente eines Antikörpers oberhalb der in der *hinge*-Region befindlichen Disulfidbrücken von dem konstanten Fc-Fragment (*fragment crystallisable*), bestehend aus  $C_{H2}$  und  $C_{H3}$ , abgespalten (Abb. 1-B). Die beiden Fab-Fragmente eines Antikörpers sind weiterhin in der Lage ihre Antigene zu binden, durch das Fehlen des Fc-Fragments ist jedoch keine Aktivierung des Immunsystems mehr möglich, da keine Bindung an die sogenannten Fc-Rezeptoren (FcR) erfolgen kann bzw. keine Aktivierung des Komplementsystems (Peter C. Heinrich et al., 2014). Zudem vermittelt der Fc-Teil eine lange Serumhalbwertszeit der Antikörper von ca. 21 Tagen (Vidarsson et al., 2014). Der Pepsin-Verdau von Antikörpern erzeugt durch die Spaltung unterhalb der Disulfidbrücken in der *hinge*-Region neben dem Fc-Teil ein  $F(ab')_2$ -Fragment. Dieses besitzt im Vergleich zum Fab-Fragment zwei Antigen-bindende Teile (Murphy et al., 2009).

### 1.1.2 Antikörper in der Diagnostik und Therapie

Therapeutische und diagnostische Antikörper zählen zu den erfolgreichsten biologischen Wirkstoffen, die derzeit klinische Anwendung finden, erkennbar auch daran, dass sich unter den zehn umsatzstärksten Medikamenten des Jahres 2014 fünf Antikörper bzw. Antikörper-Fragmente befinden (Schmid and Hammelehle, 2016; Schüler, 2016). Spitzenreiter mit 12,5 Mrd. US\$ Umsatz ist der TNF-spezifische Antikörper Humira® von AbbVie zur Behandlung entzündlicher Erkrankungen, wie der rheumatoiden Arthritis oder Morbus Crohn. Durch Humira® wird die Bindung des Liganden TNF (*tumor necrosis factor*) an seine Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 blockiert, was eine entzündliche Reaktion bei dieser Erkrankung unterbindet (Schüler, 2016).

Neben entzündlichen Erkrankungen sind diverse Krebserkrankungen ein weiteres Haupteinsatzgebiet therapeutischer Antikörper. Der erste therapeutisch zugelassene Antikörper in der Krebstherapie ist der anti-CD20 (B-Zell Antigen) Antikörper MabThera® zur Behandlung des Non-Hodgkin-Lymphoms (B-Zell-Lymphom). Über 90 % der entarteten B-Zellen exprimieren CD20. Die Wirkung von MabThera® beruht auf der Aktivierung biologischer Effektorfunktionen, wie der Komplement-vermittelten Zytotoxizität (*complement-dependent cytotoxicity*, CDC) und der Antikörper-abhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*, ADCC) nach Antigenbindung (Plosker and Figgitt, 2003; Smith, 2003). Antikörper, die gegen tumorassoziierte Antigene gerichtet sind, können durch eine Konjugation an Toxine, Chemotherapeutika und Radioisotope auch ohne die Aktivierung spezifischer Signalwege toxisch auf die Zielzellen wirken (Little, 2015).

Der Wirkmechanismus von Antikörpern in der Tumorthherapie beruht jedoch nicht nur auf der Erkennung von tumorassoziierten Antigenen und der Aktivierung von Immun-Effektorfunktionen. Ebenso findet die Blockade verschiedener für den Tumor wichtiger Stoffwechsignale Anwendung, wie beispielsweise durch den Angiogenesehemmer AVASTIN® von Roche. Dieser ist gegen den Wachstumsfaktor VEGF (*vascular endothelial growth factor*) gerichtet und ist für die Therapie von sechs verschiedenen Krebserkrankungen zugelassen (Darm-, Lungen-, Brust-, Nieren-, Eierstock- und Gebärmutterhalskrebs). Er zählt ebenfalls zu den zehn umsatzstärksten Medikamenten weltweit (Schüler, 2016; Willett et al., 2004). Tabelle 1 zeigt einige wichtige der zurzeit für Therapie und Diagnostik zugelassenen

Antikörper. Zudem gibt es noch Dutzende weitere Antikörper, die sich momentan in klinischen Studien befinden.

**Tabelle 1: Auszug einiger momentan zugelassener monoklonaler Antikörper in Therapie und Diagnostik**

Antikörper	Handelsname	Antigen	Isotyp	Einsatzgebiet
Adalimumab*	Humira	TNF	IgG1	entzündliche Erkrankungen
Alemtuzumab	Lemtrada	CD52	IgG1	Chronische lymphatische Leukämie; Multiple Sklerose
Basiliximab	Simulect	IL2R	IgG1 (chimär)	Prophylaxe von Transplantatabstoßungen
Bevacizumab*	Avastin	VEGF	IgG1	metastasierende Krebserkrankungen
Canakinumab	Ilaris	IL1 $\beta$	IgG1	entzündliche Erkrankungen
Denosumab	Prolia	RANKL	IgG2	Osteoporose, Metastasen im Knochen
Evolocumab	Repatha	PCSK9	IgG2	Hypercholesterinämie, Dyslipidämie
Infliximab*	Remicade	TNF	IgG1	entzündliche Erkrankungen
Mepolizumab	Nucala	IL5	IgG1	Asthma
Panitumumab	Vectibix	EGFR	IgG2	metastasierendes, kolorektales Karzinom
Palivizumab	Synagis	A-Epitop des Fusionsproteins	IgG1	Prävention von <i>Respiratory- Syncytial-Virus</i>
Pembrolizumab	Keytruda	PD1	IgG4	malignes Melanom
Rituximab*	MabThera	CD20	IgG1	Non-Hodgkin-Lymphom, rheumatoide Arthritis
Sulesomab**	Leukoscan	NCA90/CEA	IgG1 (Fab)	Entzündungs- Szintigraphie
Trastuzumab*	Herceptin	Her2/neu	IgG1	Brustkrebs, Magenkrebs

\*Umsatzstärkste Antikörper der Jahre 2012-2015

\*\*zusätzliche Markierung mit dem radioaktiven Technetium notwendig.

Da der Einsatz therapeutischer Antikörper auch das Risiko einer Immunreaktion gegen diese mit sich bringt, werden bevorzugt chimäre, humanisierte oder humane Antikörper eingesetzt. Chimäre und humanisierte Antikörper sind Hybride aus humanen und murinen Antikörper-Fragmenten. Beide Varianten sind bis auf die V<sub>H</sub> und V<sub>L</sub> bzw. die CDRs vollständig humanisiert, was dazu beiträgt, ungewünschte Immunreaktionen gegen die murinen Bestandteile zu minimieren (Schmid and Hammelehle, 2016).

Im therapeutischen und diagnostischen Bereich werden hauptsächlich monoklonale Antikörper eingesetzt. Dabei handelt es sich um Antikörper, deren Ursprung auf einen einzelnen B-Lymphozyten zurück zu führen ist und sich in ihrer Spezifität somit gegen ein einzelnes Epitop richtet. Das Problem der limitierten Lebensdauer der Antikörperproduzierenden B-Lymphozyten wird über die Hybridom-Technik umgangen. Hierbei werden die B-Lymphozyten mit teilungsfähigen Myelomzellen (Krebszellen) zu Hybridomen fusioniert. Die daraus resultierenden Hybridomzellen weisen ein stark expandierendes Wachstum auf mit der gleichzeitigen Eigenschaft Antikörper zu produzieren, was eine nahezu unendliche Produktion ermöglicht (Kohler and Milstein, 1975). Polyklonale Antikörper gehen hingegen nicht nur aus einem B-Lymphozyten hervor, sondern aus mehreren und können somit verschiedene Epitope eines Antigens erkennen.

Die Spezifität monoklonaler Antikörper gegen ein einzelnes Epitop bildet außerdem die Grundlage für zahlreiche Methoden in der Forschung und für diagnostische Verfahren. Diese Immunoassays sind den Methoden der Enzymdiagnostik im Hinblick auf Empfindlichkeit und Vielseitigkeit stark überlegen und können je nach Anwendung sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eingesetzt werden. Eines der am häufigsten genutzten Verfahren ist der ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*), beispielsweise zur Untersuchung des Antikörpertiters nach Impfungen oder Infektionen. In diesem Fall findet ein indirekter ELISA Anwendung. Dabei wird das Antigen auf einer Polystyroloberfläche immobilisiert. Nach Bindung des nachzuweisenden Antikörpers an sein Antigen wird dieser über die Bindung eines zweiten, Enzym-markierten Antikörpers detektiert. Als Reporterenzym wird in den meisten Fällen die Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase*; HRP) eingesetzt. Antikörper werden neben Enzymen häufig auch mit fluoreszierenden Stoffen wie Phycoerythrin konjugiert. Diese Art von Antikörpern findet vor allem in der Durchflusszytometrie, genauer gesagt bei FACS-Analysen, Anwendung (*fluorescence-activated cell sorting*). Die Methode zählt zur Routinediagnostik in verschiedenen klinischen Bereichen wie der Hämatologie, Infektionsbiologie und Immunbiologie. Die hier verwendeten Fluoreszenz-markierten Antikörper binden in den meisten Fällen an charakterisierte Oberflächenmarker von Immunzellen. Anhand der Signalstärke, die mit definierten Standardprofilen verglichen wird, können Rückschlüsse auf numerische Verhältnisse verschiedener Immunzellen geschlossen werden (David H. Peters, 1995; Schmid and Hammelehle, 2016; Siddiqui, 2010). Eine weitere Möglichkeit der Antikörper-Markierung sind radioaktive Substanzen. Radioaktiv-markierte Antikörper zählen



zu den wichtigsten Werkzeugen in der *in vivo* Diagnostik von Entzündungsreaktionen und der Onkologie. Dieses Einsatzgebiet wird auch als Immunszintigrafie bezeichnet und stellt ein bildgebendes Verfahren der Nuklearmedizin dar. Hierbei werden dem Patienten radioaktiv-markierte Antikörper oder Antikörperfragmente injiziert, die spezifisch Antigene auf entarteten Zellen erkennen und mittels einer Gammakamera detektiert werden können. Der erste zugelassene Antikörper für diese Art von Diagnostik bindet das Tumor-assoziierte Glycoprotein 72, welches häufig von Tumorzellen bei Eierstockkrebs exprimiert wird, und ist unter dem Handelsnamen OncoScint CR103 bekannt (Bhatt et al., 2016; Pinkas et al., 1999).

Damit Antikörper oder deren Fragmente in der Therapie und in der Diagnostik eingesetzt werden können, ist es von immenser Bedeutung, dass sie hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften gegenüber dem Antigen sowie auch ihren funktionellen Eigenschaften ausreichend charakterisiert werden.

### **1.1.3 Charakterisierung von Antigen-Antikörper-Bindungen**

Zur Untersuchung der Interaktion von Antikörpern mit anderen Proteinen werden typischerweise Antikörper verwendet, die mit Stoffen wie Biotin, Iod, radioaktiven Isotopen, Fluorophoren oder Enzymen markiert sind (Hermanson, 1996). Solch eine Markierung führt allerdings fast immer zu einer heterogenen Population von Antikörpern. Denn weder die Position der Markierung noch die Anzahl der markierten Positionen lässt sich ohne weiteres genau vorhersagen. Außerdem können die verschiedenen Markierungen zu Konformationsänderungen des Antikörpers führen, die dessen Affinität zum Antigen und/oder anderen Effektorproteinen wie Fc-Rezeptoren beeinflussen können. Aus diesen Gründen wurden Verfahren zur Charakterisierung der Bindungseigenschaften von Antikörpern entwickelt, die auf nicht-markierten Antikörpern beruhen, darunter die isotherme Titrationskalorimetrie (*isothermal titration calorimetry*; ITC) (Pierce et al., 1999; Velazquez-Campoy et al., 2004). Am häufigsten findet das optische Messverfahren der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (*surface plasmon resonance spectroscopy*; SPR) Einsatz (Nguyen et al., 2015). Marktführend im Bereich dieser biosensorischen SPR-Systeme und –Assays ist Biacore® (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Biacore® ermöglicht die Detektion von Antigen-Antikörper-Bindungen sowie auch anderen Protein-Protein- bzw. Protein-DNA- Interaktionen in Echtzeit, was neben der Bestimmung der Affinität ( $K_D$ ) auch die

Bestimmung der Kinetik von Assoziation und Dissoziation zulässt ( $k_{on}$ ,  $k_{off}$ ). Die SPR-Technologie besteht im Grunde genommen aus drei Einheiten. Zum einen aus einem Biosensorchip mit einer Glasoberfläche, die mit einem dünnen Goldfilm überzogen ist und eine carboxymethylierte Dextranoberfläche besitzt. An diese hydrophile Matrix können Antigene oder Antikörper in nicht-denaturierter Form kovalent gebunden werden. Die zweite Einheit ist ein kontinuierliches Flusssystem, um die jeweiligen Antigen- oder Antikörperlösungen über die Chipoberfläche zu spülen und nicht gebundene Moleküle abzutransportieren. Außerdem wird ein Detektor benötigt, bestehend aus einer Leuchtdiode, einem Prisma und einem Diodenarray-Detektor. Dieser misst die Änderung der Massenbelegung des Biosensorchips, die durch die Interaktion von Antikörper und Antigen bzw. durch die Dissoziation eines der beiden Bindungspartner auftritt. Dabei wird nicht direkt die Masse detektiert, sondern das von der Goldoberfläche reflektierte Licht, dessen Brechungsindex sich durch das Gewicht der Bindung oder Dissoziation von Antigen oder Antikörper verändert (Thillaivinayagalingam et al., 2010).

Allerdings hat auch die SPR-Spektroskopie verschiedene Limitationen. Zum einen muss das Antigen rekombinant und funktionell verfügbar sein, was nicht für jedes Antigen trivial ist, und zumindest einer der beiden Bindungspartner, also Antikörper oder Antigen, muss in gereinigter Form vorliegen, um ihn/es auf dem Chip zu immobilisieren. Vor allem aber können in der SPR-Spektroskopie zelluläre Faktoren, die die Antigen-Antikörper-Bindung beeinflussen, nicht berücksichtigt werden. Dieser Aspekt kann vor allem bei der Analyse von Interaktionen von Antikörpern mit membranständigen Antigenen von großer Bedeutung sein, da membranständige Proteine mit dem Zytoskelett einer Zelle oder anderen Komponenten der Plasmamembran interagieren können, was wiederum die Bindung des Antikörpers stark beeinflussen kann. Zusätzlich kann die Antigen-Antikörper-Bindung auf zellulärer Ebene eine Konformationsänderung selbiger bewirken, die hier ebenfalls nicht berücksichtigt werden kann (Zheng et al., 2015). Um diese mit der zellfreien Analytik unvermeidlich auftretenden Probleme zu umgehen, sind zelluläre Bindungsstudien unumgänglich, bei denen die Bindung des Antikörpers an Antigene auf der Zelloberfläche direkt gemessen werden kann. Für solche Versuche werden allerdings, wie bereits erwähnt markierte Antikörper benötigt, die oftmals die oben diskutierte Problematik der heterogenen Markierungen aufwerfen.

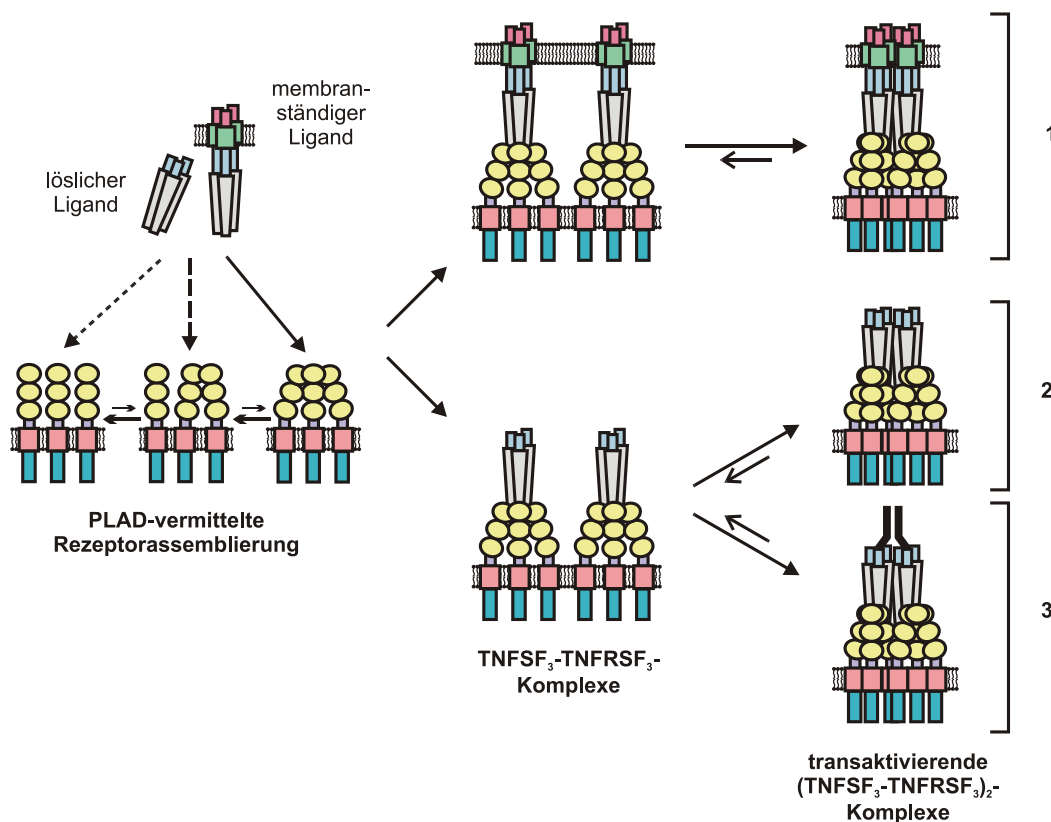
### 1.1.4 Antikörper-induzierte Signaltransduktion

Neben der Charakterisierung der Bindungseigenschaften von Antikörpern zu ihrem Antigen ist es von essentieller Bedeutung, dass therapeutische Antikörper auch hinsichtlich ihrer funktionellen Eigenschaften ausreichend analysiert werden. Im Falle von Rezeptor-bindenden Antikörpern sind dabei agonistische und antagonistische Antikörper zu unterscheiden. Antagonisten verhindern die Aktivierung des adressierten Rezeptors und blockieren z.B. die Bindung der eigentlichen Liganden, sodass keine Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion induziert werden kann (Schütt, 2011). Ein solcher Antagonist ist beispielsweise der VEGFR2 (*vascular endothelial growth factor receptor 2*)- spezifische Antikörper Cyramza®. Durch die Antikörperbindung an den Rezeptor wird die Induktion der Angiogenese durch VEGF blockiert. Damit zielt Cyramza® auf dieselbe Wirkung wie Avastin® ab, nur über einen anderen Mechanismus (Lordick and Janjigian, 2016). Im Gegensatz dazu stehen die agonistischen Antikörper, die den Rezeptor durch ihre Bindung eigenständig aktivieren können (Schütt, 2011). Agonistische Antikörper werden beispielsweise für die Tumorthherapie entwickelt bzw. bereits genutzt. Hier stellen unter anderem Todesrezeptoren der TNF (*tumor necrosis factor*)-Superfamilie, wie CD95, DR4 (TRAILR1; *tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand*) oder auch DR5 (TRAILR2) potentielle Ziele für agonistische Antikörper dar, um über sie proapoptotische Signalwege in der Tumorzelle zu induzieren. Zum anderen werden immunmodulatorische Antikörper eingesetzt, die zur Aktivierung der adaptiven Immunabwehr führen, um Krebszellen verstärkt zu bekämpfen. Dabei handelt es sich beispielsweise um CD40-spezifische Antikörper. CD40 gehört ebenfalls zu den Rezeptoren der TNF-Superfamilie und wird unter anderem auf B-Zellen, Monozyten und dendritischen Zellen exprimiert. Die Aktivierung von CD40 auf dendritischen Zellen ermöglicht eine verbesserte Prozessierung und Präsentation von Tumor-assoziierten Antigenen, sodass Tumorzellen gezielter vom Immunsystem erkannt und eliminiert werden. Ein Beispiel hierfür ist der humane IgG2-Antikörper CP-870,893 (Nimmerjahn et al., 2015; Vonderheide and Glennie, 2013).

### **1.1.4.1 Aktivierung von Rezeptoren der TNFR-Superfamilie**

Viele der heutzutage eingesetzten Antikörper, sowohl in klinischen Studien als auch zugelassene Medikamente, sind gegen Rezeptoren der Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie (TNFRSF) gerichtet (Aggarwal et al., 2012). TNFRSF werden natürlicherweise über die Liganden der TNF-Superfamilie (TNFSF) aktiviert. Die Liganden besitzen eine extrazelluläre THD (*TNF homology domain*), über die sie nicht-kovalent trimerisieren. Sie werden entweder membranständig exprimiert oder treten in löslicher Form auf. Die lösliche Form entsteht durch eine proteolytische Spaltung der membranständigen Variante in der *stalk*-Region, welche sich zwischen der Transmembrandomäne und der THD-Domäne befindet (Bodmer et al., 2002; Locksley et al., 2001). Röntgenstrukturanalysen haben gezeigt, dass jede THD-Domäne eines trimerisierten TNFSF-Liganden mit je einem Rezeptor der TNFRSF interagiert. Die Bildung eines trimeren TNFSF-Ligand<sub>3</sub> – TNFRSF-Rezeptor<sub>3</sub>-Komplexes verläuft nicht wie früher angenommen über die sequentielle Rekrutierung dreier Rezeptormoleküle, sondern über die Bindung der Liganden an inaktive, dimere oder trimere Rezeptorkomplexe in der Zellmembran. Ermöglicht wird diese Liganden-unabhängige Assemblierung über die PLAD (*pre-ligand assembly domain*) der TNFRSF-Rezeptoren (Chan et al., 2000; Papoff et al., 1999). Allerdings ist die Affinität der PLAD zueinander sehr gering, sodass es nicht unwahrscheinlich ist, dass die Mehrzahl der Rezeptoren als Monomere vorliegt. Nach der initialen Bildung des Liganden-Rezeptor-Komplexes (TNFSF<sub>3</sub>-TNFRSF<sub>3</sub>) können intrazellulär weitere Adapterproteine rekrutiert und verschiedene Signalwege aktiviert werden. Ein wichtiger Aspekt hierbei ist, dass lösliche TNFSF-Liganden zwar eine hohe Affinität für ihren Rezeptoren zeigen, in den meisten Fällen aber nach Bindung nur eine marginale Signaltransduktion induzieren. Im Gegensatz dazu stehen die membranständigen Liganden, die nach Bindung immer zu einer starken Aktivierung von Rezeptor-assoziierten Signalwegen führen (Grell et al., 1998). Membranständige Liganden besitzen eine stark eingeschränkte Mobilität in der Membran und sind somit räumlich ausgerichtet. Dadurch begünstigen sie eine sekundäre Interaktion bereits gebildeter TNFSF<sub>3</sub>-TNFRSF<sub>3</sub>-Komplexe, wodurch transaktivierende supramolekulare Signalkomplexe entstehen, die eine starke Signaltransduktion induzieren. Lösliche Liganden können solche sekundär aggregierten TNFSF<sub>3</sub>-TNFRSF<sub>3</sub>-Komplexe nur bei einer hohen Eigenaffinität der Rezeptoren zueinander bilden. Werden die löslichen TNFSF-Liganden über sekundäre Proteine oligomerisiert, zeigen sie wiederum gleiche funktionelle Eigenschaften, wie die membranständigen Liganden (Abb. 2). Die Bildung von aggregierten

TNFSF<sub>3</sub>-TNFRSF<sub>3</sub>-Komplexen ist nicht für alle TNFRSF-assoziierten Signalwege notwendig, ist jedoch im Falle der Apoptoseinduktion sowie der Aktivierung des klassischen NFκB-Signalwegs (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) sehr wichtig (Wajant, 2015).



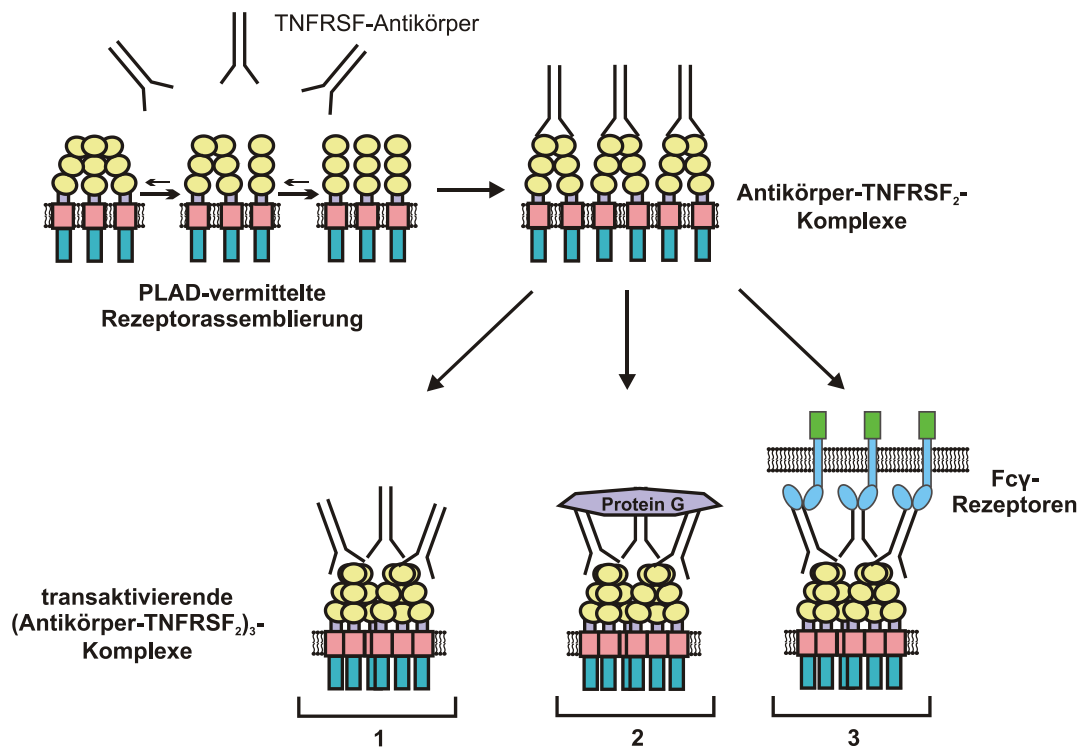
**Abbildung 2: Schematische Darstellung der Aktivierung von Rezeptoren der TNFR-Superfamilie durch lösliche und membranständige Liganden der TNFSF**

Die Abbildung zeigt die schematische Aktivierung von Rezeptoren der TNFR-Superfamilie (TNFRSF) durch Liganden der TNF-Superfamilie (TNFSF). Im Falle der membranständigen Liganden bilden sich transaktivierende Liganden-Rezeptor-Komplexe durch eine membranassoziierte Immobilisierung (1). Lösliche Liganden können solche transaktivierende Liganden-Rezeptor-Komplexe nur spontan durch eine hohe Eigenaffinität der Rezeptoren bilden (2) oder über eine sekundäre Oligomerisierung (3) beispielsweise über Liganden-spezifische Antikörper. Details sind im Text beschrieben. PLAD= *pre-ligand binding assembly domain*.

Für eine Aktivierung von TNFRSF-vermittelten Signalwegen mittels Antikörper ist es in aller Regel, wie auch bei den Liganden der TNFSF notwendig, dass mehrere sich initial bildende Antikörper-Rezeptor<sub>2</sub>-Komplexe sekundär miteinander agieren, um transaktivierende supramolekulare Antikörper-Rezeptor-Komplexe zu bilden (Abb. 3). *In vitro* gelingt dies über den Einsatz von Protein A oder Protein G (Engelmann et al., 1990). Diese Proteine besitzen mehrere Bindungsstellen für die Fc-Domänen von Antikörpern und können so mehrere Antikörper-Rezeptor<sub>2</sub>-Komplexe miteinander verknüpfen. *In vivo* wird die Bildung

transaktivierender supramolekularer Antikörper-Rezeptor-Komplexe durch die Bindung der Fc-Domänen der Antikörper an die Fc-Rezeptoren gewährleistet. Wie bei den membranständigen TNFSF-Liganden werden einzelne Antikörper-Rezeptor<sub>2</sub>-Komplexe durch diese Bindung immobilisiert und erhöhen durch diese natürliche Anhäufung die Wahrscheinlichkeit, dass mehrere solcher Komplexe sekundär interagieren (Wajant, 2015).

Allerdings sind nicht alle Antikörper-Isoformen auf eine Immobilisierung durch Fc-Rezeptoren angewiesen. Eine Ausnahme stellt beispielsweise der murine IgG3-Antikörper dar, der ein hohes Selbst-Aggregations-Potential besitzt und so per se agonistische Eigenschaften aufweist (Dhein et al., 1992). Gleiches wird der Isoform B des humanen IgG2-Antikörpers zugesprochen (White et al., 2015).



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der Aktivierung von Rezeptoren der TNFR-Superfamilie durch TNFRSF-spezifische Antikörper**

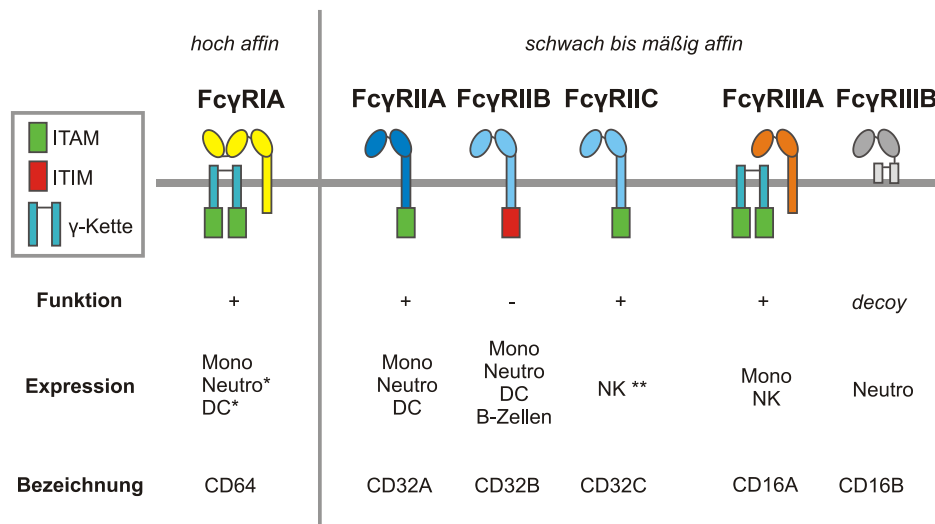
Die Abbildung zeigt die schematische Aktivierung von Rezeptoren der TNFR-Superfamilie (TNFRSF) durch TNFRSF-spezifische Antikörper. Transaktivierende Antikörper-Rezeptor-Komplexe bilden sich entweder spontan über die hohe Eigenaffinität der Rezeptoren (1), durch eine sekundäre Oligomerisierung der TNFRSF-spezifischen Antikörper oder durch eine Fcγ-Rezeptor-vermittelte, membranassoziierte Immobilisierung (3). Details sind dem Text zu entnehmen. PLAD= *pre-ligand binding assembly domain*.

### **1.1.4.2 Funktionelle und strukturelle Eigenschaften von Fc $\gamma$ -Rezeptoren**

Fc-Rezeptoren sind innerhalb verschiedener Spezies hoch konserviert, wobei der Mensch numerisch gesehen durch Genduplikationen die größte Vielfalt aufzeigt. Sie gehören zur Familie der Immunglobuline und werden in verschiedene Untergruppen gegliedert, je nachdem welche Immunglobulin-Subklasse sie binden. So interagieren IgA-Antikörper mit Fc-Alpha-Rezeptoren, IgG-Antikörper hingegen mit Fc-Gamma-Rezeptoren (Fc $\gamma$ R) (Brandsma et al., 2015).

Fc $\gamma$ R sind membranständige Proteine, die eine große Homologie zueinander zeigen. Insgesamt gibt es acht Fc $\gamma$ R-kodierende Gene, die auf Chromosom 1 lokalisiert sind. Exprimiert werden allerdings nur sechs von ihnen. Sie werden beim Menschen in zwei Gruppen gegliedert: die aktivierenden Fc $\gamma$ -Rezeptoren IA, IIA, IIC und IIIA sowie der inhibitorische Fc $\gamma$ -Rezeptor IIB (Nimmerjahn et al., 2015). Daneben gibt es noch den Fc $\gamma$ RIIB, dem allerdings keine direkte Signaltransduktion zugeschrieben wird (Abb. 4) (Brandsma et al., 2015; Salmon et al., 1995). Die aktivierenden Rezeptoren Fc $\gamma$ RIIA und Fc $\gamma$ RIIC können aufgrund ihres Aufbaus eigenständig Signalwege induzieren. Sie bestehen aus einer Liganden-bindenden  $\alpha$ -Kette, die zwei Ig-ähnliche Domänen besitzt, einer Transmembrandomäne und einem intrazellulären Teil, der das aktivierende Signalmotiv ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) beinhaltet. Fc $\gamma$ RIA und Fc $\gamma$ RIIIA haben per se keine ITAMs und müssen deshalb für eine Signaltransduktion intrazellulär mit Adapterproteinen interagieren, die jeweils ein ITAM besitzen. Je nach Zelltyp unterscheiden sich diese Adapterproteine. Bei der Mehrheit der Zellen, wie Monozyten, Makrophagen, Neutrophilen und dendritischen Zellen, handelt es sich bei dem Adapterprotein um die  $\gamma$ -Kette, bei natürlichen Killerzellen um die  $\zeta$ -Kette. Die beiden Ketten induzieren unterschiedliche Signalwege und spielen eine wichtige Rolle hinsichtlich der Expression der Fc $\gamma$ R auf der Zelloberfläche. Der inhibitorische Fc $\gamma$ -Rezeptor IIB kann wie Fc $\gamma$ RIIA und Fc $\gamma$ RIIC autonom Signalwege aktivieren, besitzt intrazellulär aber ein ITIM-Signalmotiv (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*) (Daeron et al., 2008; Nimmerjahn, 2006; Tutt et al., 2015). Des Weiteren werden Fc $\gamma$ R hinsichtlich ihrer Affinität für die verschiedenen IgG-Antikörpern unterschieden. Der Mensch besitzt mit dem Fc $\gamma$ RIA nur einen hoch-affinen Rezeptor mit  $K_D$ -Werten im nanomolaren Bereich. Die anderen Fc $\gamma$ -Rezeptoren zeigen  $K_D$ -Werten im mikromolaren Bereich. Allerdings gilt prinzipiell, dass IgG1- und IgG3- Antikörper eine höhere Affinität gegenüber den Fc $\gamma$ -Rezeptoren zeigen, als IgG2-

und IgG4- Antikörper (Brandsma et al., 2015). FcγR können nur durch einen Antikörper aktiviert werden, der das entsprechende Antigen gebunden hat. Ohne Antigenbindung zeigen die meisten Fcγ-Rezeptoren eine so geringe Affinität gegenüber Antikörpern, so dass eine FcγR-Aktivierung in Abwesenheit des Antigens durch einen Antikörper unter physiologischen Bedingungen kaum möglich ist (DiLillo and Ravetch, 2015; Wajant, 2015).



**Abbildung 4: Übersicht der humanen Fcγ-Rezeptoren**

FcγR (Fc-Gamma-Rezeptoren) werden funktionell in aktivierende Rezeptoren (+) und einen inhibierenden (-) Rezeptor eingeteilt. Daneben gibt es den *decoy*-Rezeptor FcγRIIB. Des Weiteren lassen sich die Rezeptoren in hoch affin und schwach bis mäßig affin gliedern. \* Expression durch Zytokinstimulation induzierbar, \*\* nur 10 % der Menschheit exprimieren funktionelle FcγRIIC. DC= dendritische Zellen; Mono= Monozyten; Neutro= Neutrophile; NK= Natürliche Killerzellen; ITAM= *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*; ITIM= *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*. Nach Bruhn und Jonsson, 2015 und Boross, 2008.

Aktivierende und inhibierende FcγR werden auf den verschiedenen Immunzellen koexprimiert (Abb.4). Eine Ausnahme bilden dabei B-Zellen, auf denen nur der inhibierende FcγRIIB vorzufinden ist. Ob eine aktivierende oder inhibierende Stimulation der verschiedenen Immunzellen erfolgt, ist abhängig vom Expressionslevel der einzelnen FcγR, der Affinität der IgG-Antikörper gegenüber den jeweiligen FcγR und der Zytokin-Konzentration in unmittelbarer Umgebung. Außerdem kann die Glykosylierung der Antikörper beeinflussen, welche FcγR-Effektorfunktion induziert wird. Bei den Effektorfunktionen handelt es sich hauptsächlich um nachfolgend aufgelistete Prozesse: Degranulation von Mastzellen und Neutrophilen, Freisetzung von zytotoxischen Substanzen oder inflammatorischen Zytokinen durch Makrophagen, Aktivierung von dendritischen Zellen, Antigen-Präsentation oder die



Induktion des bereits erwähnten ADCC (Nimmerjahn, 2006). Im Rahmen vieler Antikörper-basierender Tumorthapien sind diese Effektorfunktionen positive Nebenwirkungen des eigentlich angedachten Wirkmechanismus. Dieser Aspekt zeigt allerdings auch, dass die Aktivierung von Fc $\gamma$ -Rezeptoren strikt reguliert werden muss, damit keine ungewollten Immunreaktionen ausgelöst werden.

Allerdings kann der Wirkmechanismus von agonistischen Antikörpern in der Therapie auch ausschließlich durch die Aktivierung des Antigens und der damit verbundenen Aktivierung verschiedener Signalwege repräsentiert werden. Hierbei sind die Fc $\gamma$ -Rezeptoren ebenfalls von essentieller Bedeutung, da die meisten Antikörper, wie bereits erläutert wurde, durch die Bindung an diese immobilisiert werden und ihr agonistisches Potential hierdurch erst vollständig entfalten können. Dies konnte in verschiedenen Studien mit Fc $\gamma$ R-*knockout* Mäusen gezeigt werden, wie auch mithilfe von Antikörpern, die durch Mutationen im Fc-Bereich nicht mehr in der Lage sind, an Fc $\gamma$ R zu binden. Ein Beispiel hierfür ist eine Mutante des TRAILR2 (DR5)- spezifischen Antikörpers Drozitumab®(IgG1), die nicht mehr in der Lage ist mit Fc $\gamma$ R zu interagieren und dadurch *in vivo* keine agonistischen Eigenschaften mehr aufweisen kann (Li and Ravetch, 2013). Alle Fc $\gamma$ R haben prinzipiell die Eigenschaft Antikörper in potente Agonisten zu überführen, ob es *in vivo* jedoch zu einer agonistischen Wirkung kommt, hängt auch davon ab, dass Immunzellen, die den/die geeigneten Fc $\gamma$ R-Isoformen exprimieren, in der Nachbarschaft der Antigen-exprimierenden Zellen zu finden sind. Verschiedene Mausmodelle haben gezeigt, dass vor allem Fc $\gamma$ R der Isoform II eine essentielle Rolle spielen, insbesondere Fc $\gamma$ RIIB, während *knockout*-Modelle der verschiedenen aktivierenden Fc $\gamma$ R nur eine vernachlässigbare Veränderung der Aktivitäts-Induktion erkennen ließen (Hussain et al., 2015; Li and Ravetch, 2013).

## 1.2 Das TWEAK – Fn14 System

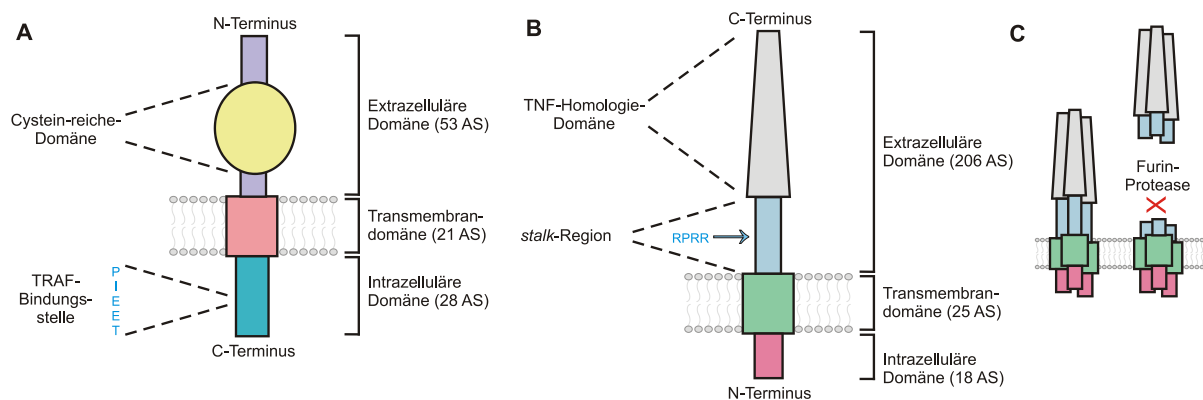
Die Liganden der TNFSF umfassen 19 strukturell verwandte Proteine, die einen oder mehrere von insgesamt 30 Rezeptoren der TNFRSF binden können. Die Bindung kann zelltypspezifisch und kontextabhängig verschiedene Signalwege aktivieren, die die Zellproliferation, entzündliche Prozesse, Zelldifferenzierung oder auch den Zelltod regulieren (Locksley et al., 2001). Viele der TNFRSF-Rezeptoren werden auf der Zelloberfläche von Immunzellen exprimiert, weshalb sie eine zentrale Rolle bei inflammatorischen- oder Autoimmun-Erkrankungen spielen, wie zum Beispiel in der rheumatoiden Arthritis. Da ihre Expression nicht nur auf Immunzellen beschränkt ist, stehen sie auch in Verbindung mit vielen weiteren Erkrankungen wie Krebs, neurologischen und kardiovaskulären Krankheiten sowie Erkrankungen des Stoffwechsels. Aus diesem Grund ist es nicht verwunderlich, dass Liganden und Rezeptoren der TNF-Superfamilie das Ziel vieler therapeutischer Ansätze darstellen. Ein prominentes Ligand-Rezeptor Paar ist das TWEAK–Fn14 System, das eine sehr wichtige Rolle im Rahmen der Regeneration von Gewebsverletzungen hat. Daneben konnte für einige Krebserkrankungen wie beispielsweise das Neuroblastom oder auch Brustkrebs eine Korrelation zwischen der Fn14-Expression und den Überlebensprognosen gezeigt werden (Burkly, 2014).

### **1.2.1 Struktur und Expression von TWEAK und Fn14**

*TNF-like weak inducer of apoptosis* (TWEAK) gehört zu den Liganden der TNFSF und ist ein Typ II Transmembranprotein. Das humane TWEAK-Gen ist auf Chromosom 17 lokalisiert und codiert für 249 Aminosäuren. Die 18 N-terminalen Aminosäuren sind intrazellulär lokalisiert und beinhalten eine potentielle Proteinkinase C-Phosphorylierungsstelle. Weitaus größer ist die C-terminale, extrazelluläre Domäne mit 206 Aminosäuren, bestehend aus der *stalk*-Region und der für Liganden der TNFSF typischen TNF-Homologie Domäne (THD) (Abb. 5-B). Sie ist essentiell für die Bildung von nicht-kovalent verbundenen Trimeren und für die Rezeptorbindung. TWEAK kommt zudem auch in löslicher Form vor. Diese Form entsteht durch die Spaltung des membranständigen TWEAKs in der *stalk*-Region mittels Serinproteasen der Furinfamilie (Abb. 5-C) (Burkly, 2014; Wajant, 2013).

Die Expression von membranständigem TWEAK konnte bisher vor allem auf verschiedenen Zellen des Immunsystems gezeigt werden, wie beispielsweise Monozyten, dendritischen Zellen und auf Interferon- $\gamma$  stimulierten natürlichen Killerzellen (Maecker et al., 2005;

Nakayama et al., 2000). Daneben konnte eine Expression auf Monozyten von Patienten mit multipler Sklerose nachgewiesen werden (Desplat-Jego et al., 2009). Leukozyten stellen die größte Quelle von löslichem TWEAK dar, welches unter anderem verstärkt in der Gelenkflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis detektiert wurde (Burkly et al., 2011). Die Induktion einer TWEAK-Expression konnte infolge von Gewebsverletzungen detektiert werden (Baxter et al., 2006).



**Abbildung 5: Struktur von Fn14 und TWEAK**

**(A)** Humanes Fn14 besitzt intrazellulär eine TRAF-bindende Domäne mit der charakteristischen Aminosäuresequenz PIEET und extrazellulär eine Cystein-reiche Domäne. **(B)** Humanes TWEAK besteht extrazellulär aus der charakteristischen TNF-Homologie Domäne und der *stalk*-Region. Innerhalb der *stalk*-Region befindet sich die Erkennungssequenz RPRR für Furinproteasen. Durch eine proteolytische Spaltung der *stalk*-Region wird membrangebundenes TWEAK in lösliches TWEAK prozessiert **(C)**. AS= Aminosäure.

*Fibroblast growth factor inducible* (Fn14) ist mit 14 kDa ein ungewöhnlich kleiner Rezeptor der TNFRSF. Das humane Fn14-Gen ist auf Chromosom 16 lokalisiert und codiert für ein 129 Aminosäure großes Typ I Transmembranprotein. Rezeptoren der TNFRSF besitzen N-terminal normalerweise zwei bis sechs Cystein-reiche Domänen (CRD; *cysteine-rich domain*), die eine wichtige Funktion im Rahmen der Ligandenbindung haben, Fn14 hingegen nur eine (Abb. 5-A) (Bodmer et al., 2002; Wiley et al., 2001; Winkles, 2008). Funktionell können TNFRSF in drei Gruppen unterschieden werden:

- 1) Todesrezeptoren mit einer konservierten intrazellulären Protein-Protein-Interaktionsdomäne (DD; *death domain*), deren Stimulation oftmals zum Zelltod führt.
- 2) TRAF (*TNF-receptor associated factor*)-interagierende Rezeptoren, die eine oder mehrere TRAF-Bindestellen besitzen.

- 3) *Decoy*-Rezeptoren, die keine eigenständige Signaltransduktion induzieren können und sowohl membranständig als auch in löslicher Form vorkommen.

Fn14 besitzt intrazellulär eine TRAF-bindende Domäne und zählt demnach zu den TRAF-interagierenden Rezeptoren (Bodmer et al., 2002; Wajant, 2013). Die Expression von Fn14 ist auf Fibroblasten, Endothelzellen und Epithelzellen in gesundem Gewebe nur sehr schwach vorhanden. Die gleichen Zelltypen zeigen allerdings eine starke Fn14-Expression, wenn sie mit Wachstumsfaktoren und Zytokinen stimuliert werden, die typischerweise bei Gewebeverletzungen, chronisch-entzündlichen Erkrankungen oder bei Fibrosen freigesetzt werden. Demnach ist es nicht verwunderlich, dass eine erhöhte Fn14-Expression bei Erkrankungen wie Hepatitis, rheumatoider Arthritis, multipler Sklerose und Arteriosklerose detektiert wurde. Eine starke Expression wurde ebenfalls auf den meisten nicht-lymphoiden Tumorzelllinien nachgewiesen (Burkly et al., 2011; Winkles, 2008).

### **1.2.2 Fn14-induzierte Signalwege**

Die Interaktion von TWEAK und Fn14 führt zur Aktivierung verschiedener Signalwege, die unter anderem zur Aktivierung von MAPK (*mitogen-activated protein kinase*)- Proteinen oder NFκB-Transkriptionsfaktoren führen. Dabei wird eine Vielzahl von biologischen Prozessen induziert, wie Proliferation, Migration, Apoptose, Gewebereparatur, Angiogenese und die Induktion verschiedener proinflammatorischer Zytokine (Burkly et al., 2007; Winkles, 2008). Nachfolgend werden die für das TWEAK-Fn14 System wichtigsten Signalwege kurz erläutert.

#### ***1.2.2.1 Der klassische und alternative NFκB-Signalweg***

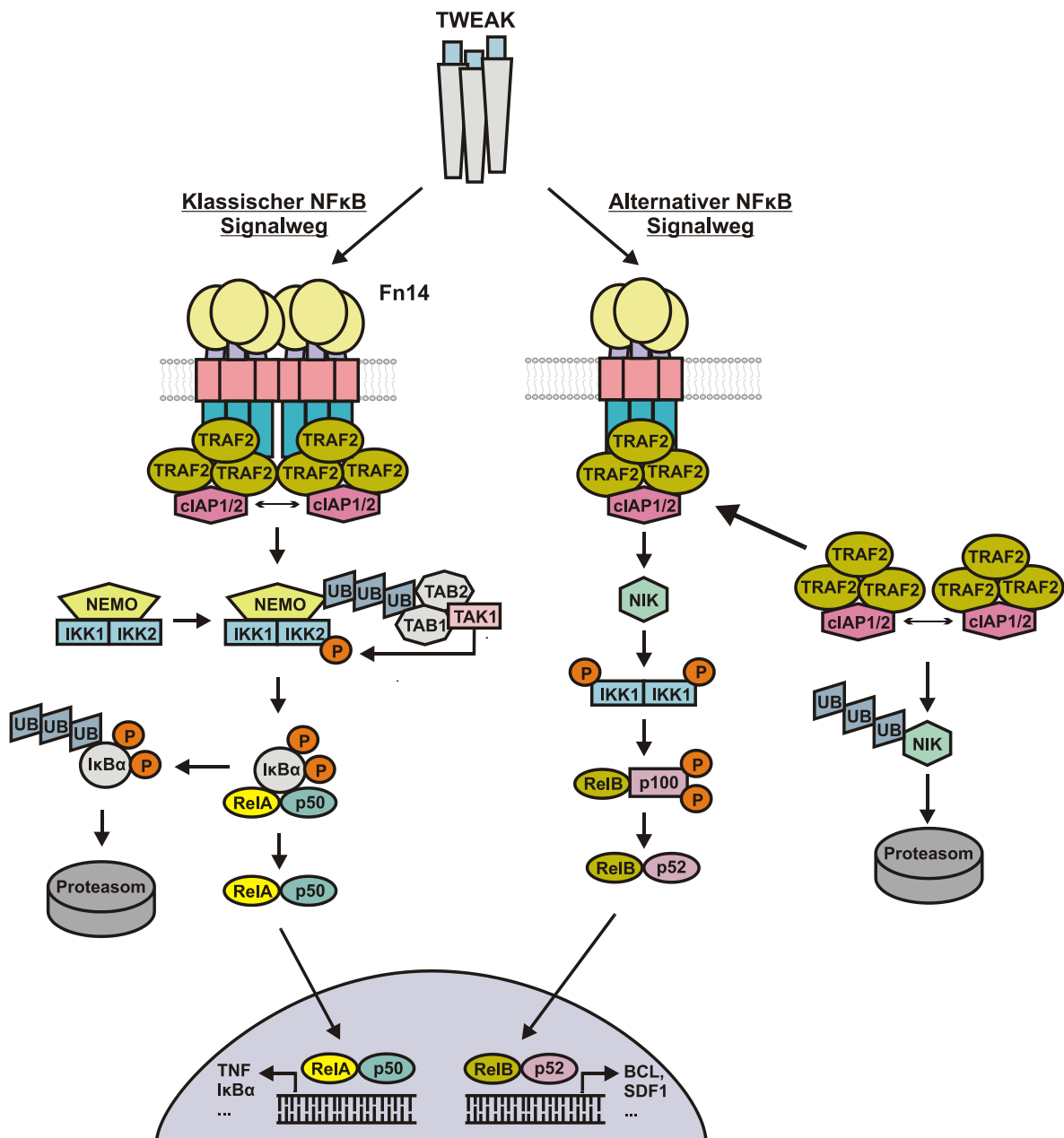
NFκB-Proteine sind ubiquitär vorkommende Transkriptionsfaktoren, die eine essentielle Rolle im Hinblick auf die Zellproliferation, den Zelltod und die Regulation der Immunantwort spielen. Sie bestehen aus Homo- oder Heterodimeren, die aus den fünf verschiedenen Proteinen der Rel-Transkriptionsfaktor-Familie gebildet werden können: p65 (RelA), c-Rel, RelB, p100/p52 und p105/p50. Charakteristisch für diese Proteine ist die N-terminale *rel homology domain* (RHD), die für die Dimerisierung, den Kerntransport und die DNA-Bindung verantwortlich ist (Verma et al., 1995). Es gibt zwei Signalwege, die zur Aktivierung der NFκB-Dimere führen können: der klassische und der alternative NFκB-Signalweg. Während der alternative Signalweg nur durch einige Mitglieder der TNFRSF aktiviert werden kann, wird der

klassische Signalweg durch fast alle Rezeptoren der TNFRSF, durch *Toll-like*-Rezeptoren oder auch äußere Einflüsse wie UV-Licht aktiviert. Das TWEAK-Fn14 System ist prinzipiell in der Lage beide Signalwege zu aktivieren (Abb. 6) (Wajant, 2013).

In unstimulierten Zellen werden dimere NFκB-Proteine, die zur Aktivierung des klassischen NFκB-Signalwegs führen, im Zytoplasma zurück gehalten, indem sie einen ternären Komplex mit den inhibitorischen IκB-Proteinen (*inhibitor of κB*) bilden, welche die NLS (*nuclear localization signal*) der NFκB-Proteine blockieren. Der zentrale Wirkmechanismus des klassischen NFκB-Signalwegs ist die Phosphorylierung der IκB-Proteine durch den IKK (*IκB kinase*)-Komplex, um deren proteasomale Degradation zu induzieren, woraufhin NFκB-Dimere in den Zellkern translozieren können. Hierfür muss zuerst der IKK-Komplex, der aus IKK1, IKK2 und NEMO (*NFκB essential modulator*) besteht, an den Rezeptor rekrutiert und aktiviert werden. Dazu werden Adapterproteine der TRAF (*TNF receptor associated factor*)-Familie benötigt. Eine wichtige Rolle spielt dabei TRAF2, das als Komplex mit cIAP1 oder cIAP2 vorliegt. Die cIAPs (*inhibitor of apoptosis*) ubiquitinylieren ihrerseits NEMO, wodurch Bindestellen für TAK1 (*TGFβ-activated kinase 1*), TAB1 (*TAK1-binding-protein*) und TAB2 entstehen. Diese werden für die Aktivierung von IKK durch eine Phosphorylierung benötigt (Abb. 6, linker Teil) (Hayden and Ghosh, 2012; Kumar et al., 2009; Oeckinghaus et al., 2011).

Das zentrale Ereignis des alternativen NFκB-Signalwegs stellt die Prozessierung des p100-Vorläuferproteins in die p52 NFκB-Untereinheit dar. Das p100-Vorläuferprotein enthält C-terminal, genau wie IκB-Proteine, eine sogenannte *Ankyrin-Repeat*-Domäne, welche die NLS des zweiten NFκB-Proteins innerhalb eines jeweiligen Dimers blockiert, wodurch die NFκB-Dimere im Zytoplasma zurückgehalten werden. Damit sie in den Zellkern translozieren können, ist eine Prozessierung des p100-Proteins zu p52 notwendig, da hierbei die *Ankyrin*-Domäne proteasomal degradiert wird. Für diese Prozessierung muss p100 durch aktiviertes IKK1 phosphoryliert werden, woraufhin p100-K48 (Lysin48) ubiquitinyliert werden kann. Letzteres ermöglicht die Degradation von p100 zu p52. Die Aktivierung von IKK1 erfolgt über eine Phosphorylierung durch NIK (*NFκB-inducing kinase*), wobei NIK in unstimulierten Zellen mittels einer Ubiquitinylierung durch den bereits erwähnten TRAF2-cIAP1/2-Komplex konstitutiv degradiert wird (Abb. 6, rechter Teil). Dies verdeutlicht die gegensätzliche Rolle von TRAF2-cIAP1/2-Komplexen im klassischen und alternativen NFκB-Signalweg, da sie sowohl

als Aktivator wie auch Inhibitor fungieren (Hayden and Ghosh, 2012; Vallabhapurapu et al., 2008; Zarnegar et al., 2008).



**Abbildung 6: Schematische Darstellung der Fn14-vermittelten Aktivierung der NFκB-Transkriptionsfaktoren**

Die Stimulation des Fn14-Rezeptors mit TWEAK kann sowohl den klassischen als auch den alternativen NFκB-Signalweg aktivieren, wobei lösliches TWEAK den klassischen NFκB-Signalweg nur sehr verzögert aktiviert. Der klassische NFκB-Signalweg zielt auf die Degradation des inhibitorischen IκBα ab, wodurch NFκB-Dimere in den Zellkern translozieren können. Zentraler Aspekt des alternativen NFκB-Signalwegs ist die NIK-abhängige Prozessierung von p100 zu p52, was ebenfalls die Translokation von NFκB-Dimeren in den Nukleus ermöglicht. Details sind im Text beschrieben. UB= Ubiquitynylierung, P= Phosphorylierung.

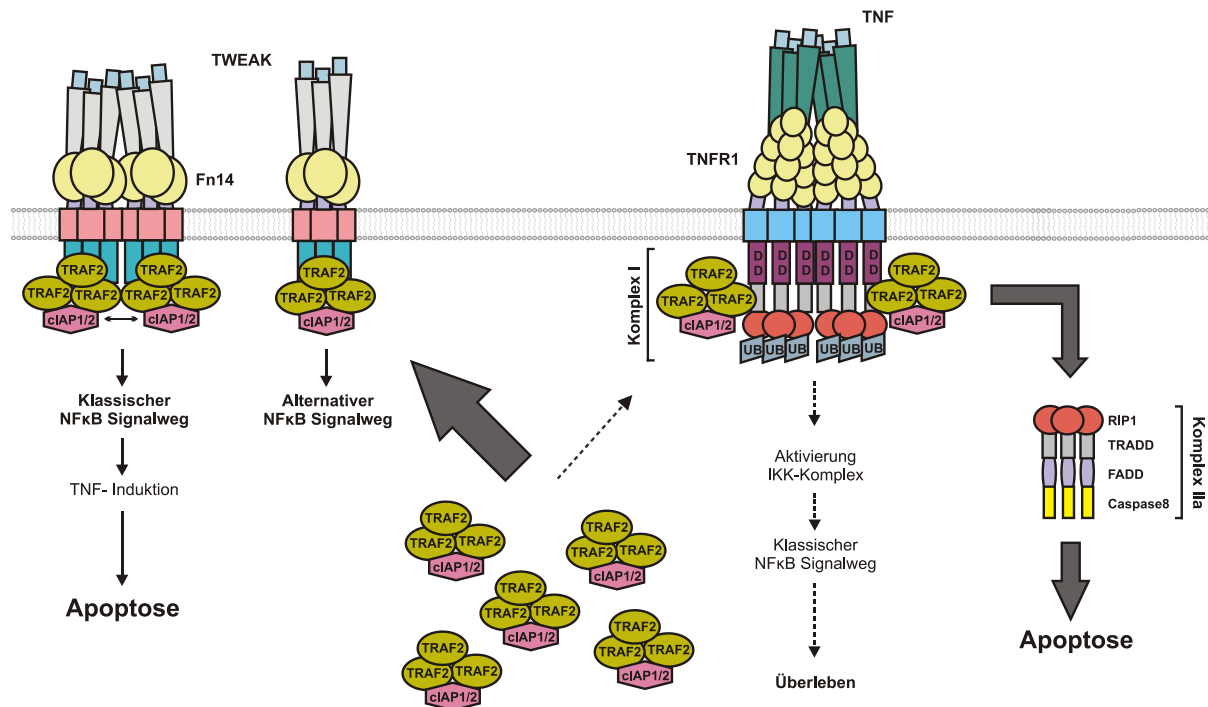
Membranständiges TWEAK kann beide NFκB-Signalwege effizient aktivieren. Lösliches TWEAK aktiviert hingegen stark bevorzugt nur den alternativen NFκB-Signalweg. Die Aktivierung des

klassischen Signalwegs durch lösliches TWEAK erfolgt nur mit großer Verzögerung und sehr schwach (Roos et al., 2010). Im Hinblick auf den generellen Aktivierungsmechanismus von Rezeptoren der TNFRSF (siehe 1.1.4.1) lässt sich daraus schließen, dass der alternative Signalweg nur einen einzigen TWEAK<sub>3</sub>-Fn14<sub>3</sub>-TRAF2-cIAP1/2 Komplex für eine effiziente Aktivierung benötigt, was sowohl von löslichem als auch membrangebundenem TWEAK induziert werden kann. Der klassische NFκB-Signalweg hingegen benötigt mehrere solcher initial gebildeten Komplexe, was wiederum nur durch den immobilisierten, membranständigen Liganden ermöglicht wird oder durch die Oligomerisierung von löslichen Liganden (Fick et al., 2012; Wajant, 2013). Dies lässt sich durch die Stöchiometrie der TRAF2-cIAP1/2-Komplexe erklären. TRAF2 bildet Homotrimer, die mit drei Fn14-Molekülen interagieren können. Ein TRAF2-Homotrimer kann allerdings nur ein cIAP1- oder cIAP2-Molekül binden. Damit die E3-Ubiquitin-Ligase der cIAPs aktiv ist, ist jedoch eine Transaktivierung zweier cIAPs notwendig (Dueber et al., 2011; Feltham et al., 2011; Zheng et al., 2010). Zur Unterbindung der NIK-Degradation in Folge einer Ubiquitylierung von NIK durch TRAF2-cIAP1/2-Komplexe ist es folglich für den alternativen NFκB-Signalweg völlig ausreichend, wenn einzelne TRAF2-cIAP1/2-Komplexe an Fn14 rekrutiert werden und nicht mehr frei im Cytoplasma verfügbar sind (Vince et al., 2008; Wicovsky et al., 2009). Im klassischen NFκB-Signalweg sind jedoch aktive TRAF2-cIAP1/2-Komplexe nach Rezeptorrekrutierung notwendig, um NEMO zu ubiquitylieren. Dies ist nur möglich, wenn mindestens zwei TRAF2-cIAP1/2-Komplexe an den Rezeptor rekrutiert werden, wofür wiederum zwei TWEAK<sub>3</sub>-Fn14<sub>3</sub> – Komplexe benötigt werden (Abb.6).

### ***1.2.2.2 Aktivierung und Sensitivierung von TNF-induzierter Apoptose***

Infolge der Aktivierung des klassischen bzw. alternativen NFκB-Signalwegs nach Stimulation mit einem TNFSF-Liganden wie TWEAK werden durch die Translokation von NFκB in den Zellkern verschiedene Zielgene aktiviert oder auch inhibiert. Eines der Zielgene, dessen Transkription aktiviert wird, ist das Gen für TNF. Die beschriebenen Rezeptoren von TNF sind der TNFR1 und TNFR2. TNFR1 gehört zur Gruppe der Todesrezeptoren der TNFRSF und kann sowohl Zellproliferation und Zellüberleben induzieren, als auch Apoptose. Die Zellproliferation wird nach TNF-Stimulation über den klassischen NFκB-Signalweg ermöglicht, der durch einen membranassoziierten Rezeptorsignalkomplex (Komplex I) induziert wird, während die Apoptose durch die Aktivierung von Caspase-8 sekundär im Zytoplasma induziert wird

(Komplex IIA). Dadurch kann die Fn14-Aktivierung indirekt über die Induktion von TNF Apoptose induzieren, wobei nicht alle Zelllinien sensitiv gegenüber diesem Mechanismus sind (Abb. 7, linker Abschnitt) (Dickens et al., 2012; Schneider et al., 1999; Vince et al., 2008).



**Abbildung 7: Schematische Darstellung der Fn14-vermittelten Apoptoseinduktion**

Eine Fn14-Stimulation kann in einigen Zelltypen durch die Aktivierung des klassischen NFκB-Signalwegs und die damit verbundene TNF-Synthese direkt Apoptose induzieren (linker Abschnitt). In Zellen, die nicht direkt toxisch auf eine TWEAK-Stimulation reagieren, kann bei zusätzlicher TNFR1-Stimulation über die Depletion von freien TRAF2-cIAP1/2-Komplexen indirekt Apoptose induziert werden (rechter Abschnitt). Für Details siehe Text. DD= *death domain*, UB= Ubiquitinylierung.

Zudem konnte gezeigt werden, dass eine Fn14-Stimulation einige Zelltypen für TNF-induzierte Apoptose sensitivieren kann. Dieser Mechanismus beruht auf der Depletion von freien TRAF2-cIAP1/2-Komplexen im Zytoplasma infolge einer Fn14-Aktivierung, da verhältnismäßig sehr viel mehr Fn14-Moleküle vorhanden sind als TRAF2-cIAP1/2-Komplexe. Somit stehen keine weiteren TRAF2-cIAP1/2 Komplexe zur Rekrutierung an den TNFR1 über TRADD (*TNFR1 associated death domain protein*) und der damit verbundenen Bildung des Komplex I zur Verfügung. Komplex I besteht neben dem TRAF2-cIAP1/2-Komplex und TRADD unter anderem aus der Kinase RIP1 (*receptor-interacting protein 1*). RIP1 wird innerhalb dieses Komplexes von cIAP1/2 ubiquitinyliert, was nachfolgend unter anderem über die Rekrutierung von NEMO zur Aktivierung des IKK-Komplexes führt und damit verbunden auch zur Aktivierung des klassischen NFκB-Signalwegs. Ohne TRAF2-cIAP1/2 Komplexe kann RIP1 nicht ubiquitinyliert



werden und bildet stattdessen den zytosolischen Komplex IIA bestehend aus TRADD, FADD (*Fas-associated protein with death domain*) und Caspase-8. Dies führt zur Caspase-8 abhängigen Induktion von Apoptose (Abb. 7, rechter Abschnitt) (Li et al., 2006; Micheau and Tschopp, 2003; Ofengeim and Yuan, 2013; Tada et al., 2001; Wicovsky et al., 2009).

### 1.2.3 TWEAK und Fn14 als therapeutische Ziele

Die wichtige Rolle von TWEAK und Fn14 zur Induktion inflammatorischer Signalwege im Rahmen von Gewebsverletzungen, aber auch die erhöhte Expression in verschiedenen Erkrankungen wie Krebs, machen das Ligand-Rezeptor Paar zu einem therapeutisch sehr interessanten Ziel. Die Ansatzpunkte therapeutischer Pläne sind vielseitig und zielen je nach Krankheitsbild sowohl auf die Inhibition als auch auf die Aktivierung von Fn14-assoziierten Signalwegen ab. Eine Aktivierung wird zum Beispiel zur Regeneration verschiedener Gewebe nach Verletzungen angestrebt, eine Inhibition zur Unterdrückung des Tumorwachstums indem die Angiogenese oder die Zellmigration blockiert wird.

Im Rahmen einer Therapie, die auf die Aktivierung der Fn14-induzierten Signalwege abzielt, findet unter anderem lösliches TWEAK Einsatz. Allerdings ist lösliches TWEAK, wie bereits beschrieben, nicht in der Lage, alle Fn14-induzierten Signalwege zu aktivieren und besitzt zudem eine sehr kurze Serumhalbwertszeit. Letzteres kann durch die Fusion von TWEAK an ein Protein mit längerer Serumhalbwertszeit wie Serumalbumin gelöst werden (Muller et al., 2010). Eine weitere Möglichkeit stellt die Fusion mit dem Fc-Teil eines Antikörpers dar, was nicht nur die Serumhalbwertszeit erhöht, sondern auch eine Dimerisierung der TWEAK-Trimere ermöglicht. Die daraus resultierenden TWEAK-Hexamere sind im Gegensatz zu den Trimeren in der Lage, alle Fn14-induzierten Signalwege zu aktivieren (Roos et al., 2010). Bei der Fusionierung von Proteinen mit dem Fc-Teil eines Antikörpers muss jedoch beachtet werden, dass der Fc-Teil *in vivo* mit den unterschiedlichen Fc-Rezeptoren interagieren und dadurch Ziel-unabhängige Effektorfunktionen aktivieren kann. Mutationen im Bereich des Fc-Teils, die die FcR-Bindung verhindern, können dieses Problem lösen. Neben den verschiedenen Formen von löslichen TWEAK zur Aktivierung von Fn14-induzierten Signalwegen, werden immer häufiger agonistische Antikörper verwendet, die spezifisch an Fn14 binden. Die Effizienz ist dabei stark abhängig vom Isotyp der jeweiligen Antikörper und von der Verfügbarkeit FcR-exprimierender Zellen. Viele Antikörper zeigen nur aktivierende

Eigenschaften, wenn eine Immobilisierung durch Fc-Rezeptoren möglich ist (Salzmann et al., 2013). Fn14-spezifische Antikörper mit antagonistischen Eigenschaften werden hingegen eingesetzt, um Fn14-induzierte Signalwege zu inhibieren. Eine weitere Strategie hierfür ist das Abfangen von löslichem oder das Blockieren von membrangebundenem TWEAK durch anti-TWEAK Antikörper oder durch lösliches Fn14. Die lösliche Fn14-Ektodomäne besitzt wie TWEAK jedoch eine sehr kurze Serumhalbwertszeit und wird deswegen ebenfalls häufig mit Proteinen fusioniert, die eine längere Serumhalbwertszeit aufweisen. Der Einsatz von TWEAK- oder Fn14-spezifischen Antikörpern kann wie auch die Fusionierung von Fn14 oder TWEAK mit dem Fc-Teil eines Antikörpers zur Aktivierung von Effektorfunktionen über FcγR führen. Im Falle von Tumorzellen, die beispielsweise TWEAK oder Fn14 auf ihrer Zelloberfläche exprimieren, wird dieser Effekt genutzt, um gezielt ADCC an den Tumorzellen zu induzieren (Burkly, 2014; DiLillo and Ravetch, 2015; Wajant, 2013).

### **1.3 Zielsetzung dieser Arbeit**

Antikörper werden heutzutage im Rahmen sehr vieler Therapien zur Bekämpfung verschiedenster Erkrankungen eingesetzt. Hierfür ist es von großer Bedeutung, dass die jeweiligen Antikörper bezüglich ihrer Eigenschaften so genau wie möglich charakterisiert werden, um einen bestmöglichen Therapieerfolg zu erzielen und potentielle Nebenwirkungen so gut wie nur möglich zu unterbinden. Dazu zählt initial präklinisch vor allem die Charakterisierung der Bindungseigenschaften der Antikörper an ihr Antigen aber auch zu den Fc-Rezeptoren. Bisher angewandte Techniken weisen hierbei allerdings große Limitationen auf, da es sich meist um zellfreie Verfahren handelt. Aus diesem Grund sollte im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit am Beispiel des Fn14-spezifischen Antikörpers 18D1 ein Antikörper-Fusionsproteinformat entwickelt werden, das eine einfache Markierung zum quantitativen Nachweis des Moleküls und zelluläre Bindungsstudien erlaubt und möglichst nicht mit den Eigenschaften des Antikörpers interferiert.

## 2. Materialien

### 2.1 Chemikalien, Reagenzien und Zellkulturmedien

1kb DNA-Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot (GER)
2-Propanol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen (GER)
ABTS	Roche, Mannheim (GER)
ABTS-Puffer	Roche, Mannheim (GER)
Acrylamid (30 %)	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Agar	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Agarose	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Anti-FLAG M2 Agarose	Sigma-Aldrich, Deisenhofen (GER)
Ammoniumpersulfat (APS)	AppliChem, Darmstadt (GER)
Ampicillin	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Cycloheximid (CHX)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen (GER)
<i>Column performance check standard aqueous SEC1</i>	Phenomenex, Aschaffenburg (GER)
DMEM Medium	Sigma-Aldrich, Steinheim (GER)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Di-Natriumhydrogenphosphat	AppliChem, Darmstadt (GER)
Dulbecco's PBS (Phosphate Buffered Saline)	Sigma-Aldrich, Steinheim (GER)
Essigsäure	Sigma-Aldrich, Deisenhofen (GER)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Ethanol, absolut	Sigma-Aldrich, Deisenhofen (GER)
Glycerol (86 %)	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Glycin	AppliChem, Darmstadt (GER)
FACSFlowTM	BD Biosciences, Heidelberg (GER)
FACS Clean	BD Biosciences, Heidelberg (GER)
FACS Rinse	BD Biosciences, Heidelberg (GER)
FLAG-Peptid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen (GER)
Fötales Kälberserum (FCS)	GIBCO (USA)
Hefeextrakt	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Kristallviolett (CV-Pulver)	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
<i>Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis</i>	GE Healthcare, Garching (GER)
Methanol	Sigma-Aldrich, Schnelldorf (GER)
Midori Green	Advance Biozym, Hessisch-Oldendorf (GER)
Milchpulver	Sigma-Aldrich, Deisenhofen (GER)
Natriumdihydrogenphosphat	AppliChem, Darmstadt (GER)
Natriumchlorid	AppliChem, Darmstadt (GER)
Nitrozellulosemembran	Schleicher & Schuell, Dassel (GER)

N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin, TEMED	Sigma-Aldrich, Deisenhofen (GER)
Polyethylenimine	Polysciences Europe GmbH, Eppelheim (GER)
Pepton	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Blue Protein Standard (Broad Range)	New England Biolabs, Frankfurt (GER)
Penicillin/Streptomycin (100 x)	Sigma-Aldrich, Steinheim (GER)
Protein G, rekombinant	Merck-Millipore, Massachusetts (USA)
RPMI 1640 Medium	Sigma-Aldrich, Steinheim (GER)
Salzsäure	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Tris	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Trypsin/EDTA-Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim (GER)
Tween-20	Roth, Karlsruhe (GER)
zVAD-fmk	Bachem, Heidelberg (GER)
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen (GER)

## 2.2 Enzyme

<i>Calf Intestine Alkaline Phosphatase</i> (CIAP)	Fermentas, St. Leon-Rot (GER)
Restriktionsendonukleasen (Klonierungen)	Fermentas, St. Leon-Rot (GER)
T4-Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot (GER)

## 2.3 Antikörper

Anti-CD16-PE	Maus IgG1	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz (USA)
Anti-CD64-PE	Maus IgG1	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz (USA)
Anti-CD32A/C	Maus IgG1	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz (USA)
Anti-CD32B	Maus IgG1	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz (USA)
Anti-FLAG (M2)	Maus IgG1, monoklonal	Sigma-Aldrich, Schnelldorf (GER)
Anti-Fn14-PE	Maus IgG2B, monoklonal	eBioscience, San Diego (USA)
Anti-Maus-HRP	Rabbit, polyklonal	Dako-Cytomation, Glostrup (DK)
Anti-Maus-PE	Ziege, polyklonal	Sigma-Aldrich, Schnelldorf (GER)
Maus IgG1-PE	Maus IgG1-PE	R&D Systems, Minneapolis (USA)
Maus IgG2B-PE	Maus IgG2B	eBioscience, San Diego (USA)

## 2.4 Kommerzielle Kits

BioLux Gaussia Luciferase Assay Kit	New England Biolabs, Frankfurt (GER)
DNA-Gelextraktion NucleoSpin® Extract II Kit	Machery-Nagel, Düren (GER)
KOD Hot Start DNA Polymerase	Merck Millipore, Darmstadt (GER)
OptEIA IL8-ELISA Kit	BD Biosciences, Heidelberg (GER)
PageSilver™ Silver Staining Kit	Fermentas, St. Leon-Rot (GER)
Pierce ECL Western Blotting Substrate	Fermentas, St. Leon-Rot (GER)
Pure Yield Plasmid Miniprep/Midiprep System	Promega, Mannheim (GER)
Rapid DNA Ligation Kit	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot (GER)

## 2.5 Geräte, Verbrauchs- und Labormaterial

Agfa Curix 60 Entwicklermaschine	Agfa, Düsseldorf (GER)
Autoklavierbeutel	Hartenstein, Würzburg (GER)
Äkta Avant 150	GE Healthcare, Freiburg (GER)
BioSep-SEC-S3000	Phenomenex, Aschaffenburg (GER)
CO <sub>2</sub> -Inkubator Heraeus Cell Safe	Heraeus, Hanau (GER)
Dialyseschlauch "Viking", MWCO 15kDa	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Durchflusszytometer FACSCalibur	BD Biosciences, Heidelberg (GER)
Durchflusszytometrie Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht (GER)
Eismaschine AF-80	Scotsman, Mailand (I)
Elektrophoresesystem "Mini-Protean Tetra Cell"	BioRad, München (GER)
ELISA Plates (96-well; high binding)	Greiner, Frickenhausen (GER)
Eppendorf-Pipetten: 0,5-10; 10-100; 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg (GER)
Feinwaage ATL623	Sartorius Acculab Atilon, Göttingen (GER)
Gefrierschrank -20°C Comfort	Liebherr, Biberach a.d. Riss (GER)
Gefrierschrank -80°C HFU586 Basic	Heraeus Med, Hanau (GER)
Gellaufkammern SDS-PAGE	PeqLab, Erlangen (GER)
Gene Quant Pro RNA/ DNA Calculator	Biochrom Ltd., Cambridge (UK)
Glaspipetten	Brand, Wertheim (GER)
Glaspasteurpipetten	Brand, Wertheim (GER)
Handzähler	neoLab, Heidelberg (GER)
Heizblock	PeqLab, Erlangen (GER)
Heraeus Pico 17	Thermo Scientific, Osterode (GER)
Intas Gel iX20 Imager	Intas Science Imaging Instruments, Göttingen (GER)
Kryoröhrchen	Greiner, Frickenhausen (GER)

---

Kühlraum 4°C	Genheimer, Höchberg (GER)
Lichtmikroskop	EVOSxL AMG Digital inverted Microscope
LUmo Luminometer	Anthos Labtec, Krefeld (GER)
Luminometer/ELISA-Reader Lucy 2	Anthos Labtec, Krefeld (GER)
Magnetrührer 720-HPS	VWR, Darmstadt (GER)
Multikanalpipetten	Eppendorf, Hamburg (GER)
Multistepper Pipette	Brand, Wertheim (GER)
Multi- <i>well</i> Platten	Greiner, Frickenhausen (GER)
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen (GER)
Nitril-Handschuhe	Medline, Kleve (GER)
Nitrozellulosemembran, 0.2 µM Porengröße	Whatman, Dassel (GER)
Parafilm M (38 m x 10 cm)	Hartenstein, Würzburg (GER)
PCR-Thermocycle Primus	MWG Biotech, Ebersberg (GER)
pH-Meter	Mettler Toledo, Giessen (GER)
Pipettus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt (GER)
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht (GER)
Plastik Pipetten	Greiner, Frickenhausen (GER)
Polypropylenröhrchen	Greiner, Frickenhausen (GER)
Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht (GER)
Röntgenfilme, Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare, Garching (GER)
Schüttler/Kippwippe	Hartenstein, Würzburg (GER)
Schutzbrille	neoLab, Heidelberg (GER)
Sterilfilter (0,2 µm)	Sarstedt, Nümbrecht (GER)
Sterilwerkbank	Heraeus, Hanau (GER)
Stromquelle EPS 301	GE Healthcare, Garching (GER)
Stromquelle EV202	Peqlab Biotechnologie, Erlangen (GER)
Tischzentrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg (GER)
Vortexer Genie 2	Carl Roth, Karlsruhe (GER)
Waage BA2100	Sartorius Acculab Atilon, Göttingen (GER)
Wäageschälchen	Hartenstein, Würzburg (GER)
Wasserbad Typ3043	Köttermann, Würzburg (GER)
Whatman-Papier	Hartenstein, Würzburg (GER)
Wet-Blotkammer	PeqLab, Erlangen (GER)
Zellkulturflaschen	Greiner, Frickenhausen (GER)
Zellkulturplatten	Greiner, Frickenhausen (GER)
Zellkulturschalen	Greiner, Frickenhausen (GER)
Zentrifuge Rotana 460R	Hettich, Tuttlingen (GER)
Zellschaber mit Drehkopf	Hartenstein, Würzburg (GER)

## 2.6 Lösungen und Puffer

Assay Diluent (ELISA)	1 x PBS 10 % (v/v) FCS
Blotpuffer	0,025 M Tris 0,192 M Glycin 20 % (v/v) Methanol pH 8,3
Coating Buffer (ELISA)	0,1 M Natriumcarbonat pH 9,5
Einfriermedium (Zellkultur)	10 % DMSO in FCS
Kristallviolettlösung	20 % (v/v) Methanol 0,5 % (w/v) Kristallviolett
Laemmli-Puffer (SDS-PAGE, 4 x)	8 % (w/v) SDS 10 % $\beta$ -Mercaptoethanol 40 % Glycerol 0,2 M Tris 0,04 % Bromphenolblau
Laufpuffer (SDS-PAGE)	0,05 M Tris 0,38 M Glycin 0,004 M SDS pH 8,3
LB Agar Medium	1x LB Medium (5-fach konzentriert) 1,5 % (w/v) Agar Agar in ddH <sub>2</sub> O
LB Medium (5-fach konzentriert)	10 g/l Pepton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l Natriumchlorid
PBS ( <i>Phosphate buffered saline</i> )	0,02 M Natrium-Phosphat 0,7 % (w/v) Natriumchlorid pH 7,2
PBST	1 x PBS 0,05 % (v/v) Tween-20

---

PBST in Milch	1 x PBS 0,05 % (v/v) Tween-20 5 % (w/v) Magermilch
Puffer I (Mini-DNA-Präparation)	50 mM TRIS/ HCl, pH 7,5 10 mM EDTA, pH 8,0 0,1 mg/ml RNase A
Puffer II (Mini-DNA-Präparation)	0,2 M Natriumhydroxid 1% (w/v) SDS
Puffer III (Mini-DNA-Präparation)	3 M Natriumacetat pH 4,8
Sammelgelpuffer (SDS-PAGE)	0,5 M Tris 0,015 M SDS pH 6,8
TAE-Puffer	2 M Tris 1 M Essigsäure 0,1 M EDTA pH 8,3
TBS ( <i>Tris buffered saline</i> )	0,02 M Tris 8 % (w/v) Natriumchlorid pH 7,6
Trenngelpuffer (SDS-PAGE)	1,5 M Tris 0,015 M SDS pH 8,8



## 2.7 Verwendete Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten eukaryotischen Zelllinien waren bereits in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wajant vorhanden.

HEK293	Institutseigener Vorrat	Embryonale Nierenzelllinie
HT1080	Institutseigener Vorrat	Fibrosarkomzellen
HT1080-CD40	Herstellung am Institut (Wyzgol et al., 2009)	Fibrosarkomzellen
HT1080-Fn14-KO	Herstellung am Institut (über CRISPR/cas-Plasmide)	Fibrosarkomzellen
Kym-1	Institutseigener Vorrat	Rhabdomyosarkomzellen
WiDr	Institutseigener Vorrat	Epitheliale, kolorektale Adenokarzenomzellen

Für Klonierungen und DNA-Präparationen wurde die prokaryotische Zelllinie NEB 5- $\alpha$  Competent *E. Coli* (*High Efficiency*) von New England Biolabs (Frankfurt, Deutschland) verwendet.

## 2.8 Plasmide und rekombinante Fusionsproteine

Die nachfolgend aufgeführten Plasmide zur Produktion der jeweiligen Antikörper wurden entweder von Mitarbeitern der Abteilung für Molekulare Innere Medizin zur Verfügung gestellt oder wie in 3.1 angegeben selbst kloniert (\*). Die Eintragsnummern in der Gendatenbank sind in Tabelle 2 aufgeführt.

- 1) anti-CD40-G28.5-FLAG-V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>-pCR3 (IgG1)
- 2) anti-CD40-G28.5-FLAG-V<sub>L</sub>-C<sub>L</sub>-pCR3
- 3) anti-CD40-G28.5-FLAG-V<sub>L</sub>-C<sub>L</sub>-Gaussia(w/o)-pCR3
  
- 4) anti-Fas-E09-FLAG-V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>-pCR3 (IgG1)
- 5) anti-Fas-E09-FLAG-V<sub>L</sub>-C<sub>L</sub>-pCR3
- 6) anti-Fas-E09-FLAG-V<sub>L</sub>-C<sub>L</sub>-Gaussia(w/o)-pCR3
  
- 7) anti-Fn14-18D1-FLAG-V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>-pCR3 (IgG1)
- 8) anti-Fn14-18D1-FLAG-V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>-Gaussia(w/o)-pCR3 (IgG1)
- 9) anti-Fn14-18D1-FLAG-V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>-pCR3 (IgG2)
- 10) anti-Fn14-18D1-FLAG-V<sub>L</sub>-C<sub>L</sub>-pCR3
- 11) anti-Fn14-18D1-FLAG-V<sub>L</sub>-C<sub>L</sub>-Gaussia(w/o)-pCR3
- 12) anti-Fn14-18D1-FLAG-V<sub>L</sub>-C<sub>L</sub>-Gaussia-pCR3
- 13) anti-Fn14-18D1-FLAG- V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>(m)-pCR3 (mIgG1)

- 14) anti-Fn14-18D1-FLAG-V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>(m)-pCR3 (mIgG2A)  
 15) anti Fn14-18D1-FLAG-V<sub>L</sub>-C<sub>L</sub>(m)-pCR3 \*  
 16) anti Fn14-18D1-FLAG-V<sub>L</sub>-C<sub>L</sub>(m)-Gaussia(w/o)-pCR3 \*  
 17) anti Fn14-18D1-FLAG-V<sub>L</sub>-C<sub>L</sub>-CITRIN-pCR3
- 18) anti-LTβR-BHA10-FLAG-V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>-pCR3 (IgG1)  
 19) anti-LTβR-BHA10-FLAG-V<sub>L</sub>-C<sub>L</sub>-pCR3  
 20) anti-LTβR-BHA10-FLAG-V<sub>L</sub>-C<sub>L</sub>-Gaussia(w/o)-pCR3

Nachfolgend aufgeführt sind die in der Arbeit verwendeten Antikörper-Fusionsproteine. Die in Klammern angegebenen Nummern entsprechen den für die Produktion verwendeten Plasmiden. Die Fusionsproteine wurden wiederum zum Teil selbst produziert und gereinigt (\*\*) oder waren bereits gereinigt vorhanden.

18D1-IgG1 (7+10) **	18D1-mIgG2A (14+15) **
Citrin <sub>(CT-LC)</sub> -18D1-IgG1 (7+17)	GpL <sub>(CT-LC)</sub> -18D1-mIgG2A (14+16) **
GpL <sub>(CT-HC)</sub> -18D1-IgG1 (8+10) **	
GpL <sub>(CT-LC)</sub> -18D1-IgG1 (7+11) **	BHA10-IgG1 (18+19)
GpL <sub>(NT-LC)</sub> -18D1-IgG1 (7+12) **	GpL <sub>(CT-LC)</sub> -BHA10-IgG1 (18+20)
18D1-IgG2 (9+10) **	E09-IgG1 (4+5) **
GpL <sub>(CT-LC)</sub> -18D1-IgG2 (9+11) **	GpL <sub>(CT-LC)</sub> -E09-IgG1 (4+6) **
18D1-mIgG1 (13+15) **	G28.5-IgG1 (1+2) **
GpL <sub>(CT-LC)</sub> -18D1-mIgG1 (13+16) **	GpL <sub>(CT-LC)</sub> -G28.5-IgG1 (1+3)**

Die FcγR-kodierenden pCMV-SPORT6 Expressionsplasmide, die für die transiente Transfektion von HEK293 Zellen genutzt wurden, wurden von SourceBioscience erworben. Die Eintragsnummern in der Gendatenbank der weiteren Expressionsplasmide, die für die Oberflächenproteine CD95 und LTβR kodieren, sind Tabelle 2 zu entnehmen.

**Tabelle 2: Gendatenbank-Eintragungsnummern der verwendeten Antikörper, Rezeptoren der TNFRSF und der *Gaussia princeps* Luziferase**

Konstrukt	Eintragungsnummer	Aminosäuren
18D1-V <sub>H</sub> -IgG1	Sequenz nicht veröffentlicht	-
18D1-V <sub>L</sub>	Sequenz nicht veröffentlicht	-
BHA10-V <sub>H</sub> -IgG1	(Michaelson et al., 2009)	1-113
BHA10-V <sub>L</sub>	(Michaelson et al., 2009)	1-107
CD95 (Fas)	NM_000043.5	313-1323
E09-V <sub>H</sub> -IgG1	3TJE_H (PDB Eintrag)	1-125
E09-V <sub>L</sub>	3TJE_L (PDB Eintrag)	1-111
G28.5-V <sub>H</sub> -IgG1	AJ853736	21-132
G28.5-V <sub>L</sub>	AJ853736	148-260
<i>Gaussia princeps</i> Luziferase	AAG54095.1	18-185
Human IgG1 (C <sub>H</sub> -IgG1)	AFR78282.1	121-452
Human IgG2 (C <sub>H</sub> -IgG2)	AAN76042.1	1-325
Leichte Kette Kappa (human C <sub>L</sub> )	AAD29610.1	1-106
Leichte Kette Kappa (murin C <sub>L</sub> )	ABW24730.1	105-213
LTβR	AB527559.1	10-669
murin IgG1 (C <sub>H</sub> -mIgG1)	CZF87189.1	143-468
murin IgG2A (C <sub>H</sub> -mIgG2A)	S37483	136-469

### 3. Methoden

#### 3.1 Klonierung der leichten Antikörperketten für murine 18D1-Fusionsproteine

Zur Klonierung der murinen leichten Kette von 18D1 (18D1-V<sub>L</sub>-C<sub>L</sub>(m)) mit und ohne *Gaussia princeps* Luziferase am C-terminalen Ende sowie für alle weiteren bereits vorhandenen 18D1-Antikörperformate, wurde ein modifizierter pCR3-Expressionsvektor (Invitrogen, Karlsruhe (GER)) genutzt, der neben einer Ampicillin-Resistenz N-terminal ein Immunglobulin-Signalpeptid und einen FLAG-Tag codiert (Schneider et al., 1997). Zuerst wurde das Expressionsoplasmid FLAG-18D1-V<sub>L</sub>-C<sub>L</sub>(m) kloniert, da dieses Konstrukt zur weiteren Klonierung von FLAG-18D1-V<sub>L</sub>-C<sub>L</sub>(m)-GpL(w/o) benötigt wurde. Der Parentalvektor wurde wie in Tabelle 3 angegeben mit Restriktionsenzymen verdaut und die freien DNA-Enden mit CIAP dephosphoryliert. Der Insertvektor wurde mit den gleichen Restriktionsenzymen verdaut. Es folgte eine Auftrennung der DNA-Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese. Der verdaute Parentalvektor und das verdaute Insert wurden aus dem Gel ausgeschnitten, über das DNA-Gelextraktions Kit „NucleoSpin® Extract II“ gereinigt und miteinander ligiert. Der Ligationsansatz wurde in kompetente *E.coli* Zellen transformiert. Nachdem positive Klone selektioniert wurden, wurde die DNA-Sequenz der Klone überprüft, woraufhin die Produktion der murinen Antikörper-Fusionsproteine in HEK293 Zellen begonnen wurde (siehe 3.3.1). Die Klonierung von 18D1-V<sub>L</sub>-C<sub>L</sub>(m)-GpL(w/o) erfolgte nach dem gleichen Prinzip, mit dem Unterschied, dass das Insert über PCR amplifiziert wurde. Das amplifizierte Insert wurde elektrophoretisch kontrolliert und anschließend mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut.

**Tabelle 3: Übersicht der durchgeführten Klonierungen**

	<u>Parentalvektor</u>	<u>Vektorverdau</u>	<u>Insertvektor</u>	<u>Insertverdau</u>
<b>FLAG-18D1-V<sub>L</sub>-C<sub>L</sub>(m)</b>	<u>FLAG-18D1-V<sub>L</sub>-C<sub>L</sub></u>	BamHI XbaI	<u>FLAG-K21-V<sub>L</sub>-C<sub>L</sub>(m)</u>	BamHI XbaI
<b>FLAG-18D1-V<sub>L</sub>-C<sub>L</sub>(m)-GpL(w/o)</b>	FLAG-18D1-V <sub>L</sub> -C <sub>L</sub> - <u>GpL(w/o)</u>	HindIII XhoI	<u>FLAG-18D1-V<sub>L</sub>-C<sub>L</sub>(m)</u>	HindIII XhoI

## 3.2 Zellkultur

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden unter Standardbedingungen (5 % CO<sub>2</sub> und 37 °C) in RPMI 1640 Medium mit 10 % Hitze-inaktiviertem FCS (ca. 45 min bei 56 °C) kultiviert. Nur WiDr Zellen wurden in DMEM Medium gehalten, ebenfalls mit 10 % FCS. Alle benutzten Zellen waren adhärenente Zellen. Um diese zu ernten, wurden sie mit Trypsin (0,025 %) / EDTA (10 mM) gelöst, 4 min bei 310 x g abzentrifugiert und in frischem Medium resuspendiert. 10 – 20 % der Zellen wurden für die weitere Kultivierung genutzt, der restliche Teil für Versuche eingesetzt oder kryokonserviert. Zur Weiterverwendung musste zuerst die Zellzahl über eine Neubauer-Zählkammer bestimmt werden. Für die Kryokonservierung wurden die Zellen in FCS mit 10 % DMSO aufgenommen und in einem Kryoröhrchen bei -80°C gelagert.

## 3.3 Produktion und Reinigung der Antikörper-Fusionsproteine

### 3.3.1 Produktion

HEK293 Zellen wurden transient mit den in 2.8 beschriebenen Plasmid-Kombinationen transfiziert. Dafür wurde zuerst der Transfektionsansatz, bestehend aus 2 ml RPMI 1640 Medium mit 1 % Penicillin/Streptomycin, 12 µg Plasmid-DNA (Gesamtmenge) und 36 µg PEI-Reagenz (ausreichend für eine 15cm-Zellkulturschale), für 10-15 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das Medium von konfluent bewachsenen HEK293 Zellen von RPMI 1640 Medium mit 10 % FCS auf RPMI 1640 Medium ohne FCS aber mit 1 % Penicillin/Streptomycin gewechselt. Der Transfektionsansatz wurde nun tropfenweise zu den Zellen gegeben und über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag erfolgte wiederum ein Mediumwechsel auf RPMI 1640 Medium mit 2 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin. Die transfizierten Zellen wurden für 5 -7 Tage kultiviert. Anschließend wurden die Zellüberstände mit den sekretierten Antikörper-Fusionsproteinen geerntet, 10 min bei 4630 x g abzentrifugiert und in ein neues 50 ml Falcon überführt. Die Konzentrationsbestimmung der Fusionsproteine wurde über einen Western-Blot bestimmt. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

Die transiente Transfektion der verschiedenen Oberflächenproteine wie FcγR erfolgte ebenfalls mithilfe des PEI-Reagenzes. Die transfizierten HEK293 wurden 1-2 Tage nach der Transfektion für die jeweiligen Versuche genutzt.

### 3.3.2 Anti-FLAG-Affinitätschromatographie

Die Antikörper-Fusionsproteine wurden mittels anti-FLAG-Affinitätschromatographie gereinigt. Die hierfür eingesetzten M2-Agarosebeads haben ein Fassungsvermögen von 600 µg des aufzureinigendem Proteins je 1 ml „anti-FLAG M2 Affinity Gel“. Zu Beginn wurden die M2-Agarosebeads mit TBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellkulturüberstände auf die M2-Agarosebeads-Säule gegeben mit einer Tropfgeschwindigkeit von 20 – 25 Sekunden bei 4 °C, damit die Antikörper-Fusionsproteine, die eine FLAG-Sequenz enthalten, an die M2 Agarosebeads binden konnten. Danach wurde die Säule wiederum mit TBS gewaschen. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte durch die Zugabe von 100 µg/ml FLAG-Peptid in TBS (4x Säulenvolumen). Die Antikörper-Fusionsproteine wurden in Fraktionen zu je 0,5 ml gesammelt. Die Tropfgeschwindigkeit wurde auf 25 – 30 Sekunden eingestellt. Die M2-Agarosebeads wurden nach der Elution ein weiteres Mal mit TBS gewaschen und anschließend bei -20 °C gelagert (50 % Glycerol in TBS, 0,02 % Natriumazid). Die einzelnen Eluate der Antikörper-Fusionsproteine wurden über Nacht bei 4 °C gegen PBS dialysiert, auch um das überschüssige FLAG-Peptid zu entfernen. Abschließend wurden die Eluate steril filtriert und die Konzentrationen über Western Blot und Silbergel-Färbung bestimmt. Die gereinigten Proteine wurden für kurze Zeiträume bei 4 °C aufbewahrt, für längere Zeiträume hingegen bei -20 °C.

## 3.4 Western Blot

### 3.4.1 SDS-PAGE

Zur Auftrennung der verschiedenen Antikörper-Fusionsproteine wurde ein SDS-Polyacrylamid-Gel (SDS-PAGE) verwendet, bestehend aus Trenngel und Sammelgel. Zuerst wurde das Trenngel gegossen, zusammengesetzt aus Trenngelpuffer (374 mM Tris pH 8,8; 3,75 mM SDS) und 12 % Acrylamid. Die Polymerisation erfolgte nach Zugabe von 0,1 % APS und 0,1 % TEMED. Das Trenngel wurde mit Isopropanol beschichtet, damit eine glatte Gelkante entstand. Nach erfolgreicher Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel (6 % Polyacrylamid in 123 mM Tris pH 6,8; 3,75 M SDS; 0,1% APS; 0,1% TEMED) auf das Trenngel geschichtet. Um Probenaschen für die einzelnen Proteinproben zu erhalten, wurde vor dem Polymerisieren des Sammelgels ein Kamm eingesetzt. Im Anschluss wurde der Kamm wieder entfernt und das Gel wurde mit den entsprechenden Proteinproben sowie

einem Molekulargewichtsstandard beladen. Die Proteinproben wurden zuvor 5 min bei 95 °C denaturiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 90 -130 V für ca. 100 Minuten.

### **3.4.2 Elektrotransfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran**

Der Elektrotransfer der Fusionsproteine auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte in einer Wet-Blotkammer. Hierfür wurde die Nitrozellulosemembran in Blotpuffer getränkt, auf die SDS-PAGE gelegt und in folgender Anordnung luftblasenfrei in die Blotkammer gelegt: Anode – 2 Lagen Whatman-Papier – Nitrozellulosemembran – SDS-PAGE – 2 Lagen Whatman-Papier – Kathode. Der Proteintransfer erfolgte bei Raumtemperatur und einer Stromstärke von 400 mA für 150 Minuten.

### **3.4.3 Immundetektion**

Zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen wurde die Nitrozellulosemembran nach dem Elektrotransfer der Proteine für eine Stunde bei Raumtemperatur in 5 % PBST-Milch auf einem Schüttler geschwenkt. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran dreimal für 10 min in PBST gewaschen und über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler mit dem Primärantikörper anti-FLAG (M2) inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran wiederum dreimal für 10 min mit PBST gewaschen. Es folgte eine einstündige Inkubation mit einem HRP (*horseradish peroxidase*) -konjugierten Sekundärantikörper bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Die Nitrozellulosemembran wurde danach dreimal für 10 min in PBST gewaschen. Der Proteinnachweis erfolgte unter Verwendung des ECL (*enhanced chemiluminescence*) - Systems.

### **3.5 Silberfärbung**

Zur Kontrolle der Reinheit der Antikörper-Fusionsproteine wurden je 200 ng dieser mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mit dem „PageSilver™ Silver Staining“ Kit nach Herstellerangaben gefärbt.

### **3.6 Gelfiltration (Größenausschlusschromatographie)**

Die gereinigten GpL-Antikörper-Fusionsproteine wurden mittels Größenausschlusschromatographie analysiert, um sicherzustellen, dass die Proteine keine Aggregate gebildet haben. Hierfür wurde eine BioSep-SEC-S3000 (300 x 7,8 mm) Gelfiltrationssäule genutzt, die zuvor mit PBS bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min äquilibriert wurde. Die Säule wurde anschließend mit der „column performance check standard aqueous SEC 1“- Lösung kalibriert, die aus nachfolgend aufgeführten Markerproteinen besteht: bovines Thyroglobulin (670 kDa), humanes IgA (300 kDa), humanes IgG1 (150 kDa), Ovalbumin (44 kDa) und Myoglobin (17 kDa).

### **3.7 Durchflusszytometrie**

Die Expression des Oberflächenproteins Fn14 auf HT1080 und HT1080-Fn14-KO Zellen sowie die Transfektion der FcγR in HEK293 Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie überprüft.  $1 \times 10^6$  Zellen wurden hierfür mit den jeweiligen PE-konjugierten Antikörpern und den entsprechenden Isotypkontrollen für 30 min bei 4 °C inkubiert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Es folgte die Detektion der zellgebundenen Antikörper im Durchflusszytometer. Zum Nachweis von CD32A und CD32B wurden nicht-PE-konjugierte Antikörper eingesetzt. Diese wurden nach 30 minütiger Inkubation einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit einem sekundären, isotypspezifischen, PE-konjugierten Antikörper wiederum für 30 min bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen.

### **3.8 *Gaussia princeps* Luziferaseassays**

#### **3.8.1 Gleichgewichtsbindungsstudien (Bestimmung der $K_D$ )**

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) der Antikörper an ihren Liganden wurden Gleichgewichtsbindungsstudien durchgeführt. Hierfür wurden im Falle von adhären wachsenden HT1080 Zellen  $2 \times 10^5$  Zellen in einer 24-well Platte ausgesät und über Nacht kultiviert. Transfizierte HEK293 Zellen wurden 1-2 Tage nach der PEI-Transfektion abgelöst und je  $5 \times 10^5$  Zellen in ein Eppi gegeben. Für jede Gleichgewichtsbindungsstudie wurden 12 wells mit Zellen ausgesät, die das Antigen exprimieren (totale Bindung), sowie 12 wells mit Zellen, die das Antigen nicht exprimieren (unspezifische Bindung). Analog dazu wurde mit den transfizierten HEK293 verfahren. Die Zellen wurden nun paarweise mit ansteigenden



Konzentrationen der GpL-Antikörper-Fusionsproteine für 90 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die ungebundenen Antikörper durch 10 bzw. 2 maliges Waschen in eiskaltem PBS entfernt. Darauffolgend wurden die Zellen in RPMI 1640 Medium mit 0,5 % FCS und Penicillin/Streptomycin aufgenommen. Die jeweils verwendeten HT1080-Zelltypen wurden abgekratzt und in eine schwarze 96-*well* Platte überführt, die transfizierten HEK293 Zellen wurden resuspendiert und überführt. Zur Bestimmung der Rezeptoranzahl (Antigen) pro Zelle wurden die Zellen eines *well*s/Eppis mittels Neubauer-Zählkammer gezählt. Die GpL-Aktivität der restlichen Proben wurde über eine enzymatische Reaktion mithilfe des „BioLux Gaussia Luciferase Assay Kits“ bestimmt. Gemessen wurde die Lumineszenz sofort nach Zugabe des Enzymsubstrats in einem Lucy 2 Luminometer oder einem LUmo Luminometer (Verweildauer 1 Sekunde pro *well*). Um bei der Auswertung die relativen Lichteinheiten einer Molekülzahl zuordnen zu können, wurde bei jeder Messung eine definierte Menge des GpL-Antikörper-Fusionsproteins gemessen. Die spezifische Bindung ergab sich aus der Subtraktion der unspezifischen von der totalen Bindung.

Mithilfe der Analyse-Software GraphPad Prism 5.0 konnte anschließend die Dissoziationskonstante  $K_D$  bestimmt werden. Sie beschreibt die Affinität des untersuchten GpL-Antikörper-Fusionsproteins zu seinem Antigen und gibt die Konzentration an, bei der die Konzentration des freien Antikörpers genauso hoch ist, wie die Konzentration der Antikörper-Antigen-Komplexe. Nachfolgend aufgeführt sind die Formeln und Definitionen, die der Berechnung der  $K_D$ -Werte zugrunde liegen.

**Massenwirkungsgesetz:**  $K_D = R \times L / (RL)$

**Erhaltungsgleichungen:**  $R_0 = R + (RL)$

$$L_0 = L + (RL)$$

**Definitionen:**

R: Konzentration des Antigens

L: Konzentration des freien ungebundenen Antikörpers, d.h. die bekannte Gesamtkonzentration des Antikörpers im Bindungsansatz abzüglich der gemessenen Konzentration an insgesamt gebundenem Antikörper

(RL): Konzentration der Antikörper-Antigen-Komplexe

$K_D$ : Dissoziationskonstante

$R_0$ : Gesamtkonzentration des Antigens

$L_0$ : Summe der Konzentration an freiem und gebundenem Antikörper

### 3.8.2 Homologe Konkurrenzexperimente (Bestimmung der $K_i$ )

Homologe Konkurrenzexperimente dienen der Bestimmung der Dissoziationskonstante des Inhibitors ( $K_i$ ), in diesem Fall der Dissoziationskonstante des nicht-GpL-markierten Antikörpers. Hierfür wurden wiederum  $2 \times 10^5$  adhären wachsende HT1080 Zellen in einer 24-well Platte ausgesät und über Nacht kultiviert, wohingegen transfizierte HEK293 Zellen 1-2 Tage nach der PEI-Transfektion abgelöst und je  $5 \times 10^5$  Zellen in ein Eppi gegeben wurden (jeweils nur Antigen tragende Zellen). Die Zellen wurden darauffolgend mit konstanter Konzentration der GpL-Antikörper-Fusionsproteine bei steigenden Konzentrationen des nicht-markierten Antikörpers für 90 min bei 37 °C inkubiert. Das Abwaschen der ungebundenen Antikörper sowie die Messung der zellassozierten Luziferaseaktivität erfolgten wie in 3.8.1 beschrieben.

Der  $K_i$ -Wert wurde wiederum mithilfe des Programms GraphPad Prism 5.0 ermittelt unter Anwendung nachfolgend aufgeführter Formel und Definitionen:

$$K_i = IC50 / (1 + L_0/K_D)$$

#### Definitionen:

IC50: Konzentration des Inhibitors (nicht-markierter Antikörper), bei der 50 % der Bindung des GpL-Antikörper-Fusionsproteins an den Rezeptor durch den Inhibitor blockiert wird

$L_0$ : Summe der Konzentration an freiem und gebundenem GpL-Antikörper-Fusionsprotein

$K_D$ : Dissoziationskonstante des GpL-Antikörper-Fusionsproteins, ermittelt aus Gleichgewichtsbindungsstudien

### 3.8.3 Bestimmung der Rezeptoren pro Zelle

Zur Bestimmung der durchschnittlichen Anzahl an Fn14-Molekülen auf einer HT1080 Zelle ( $N_{BS}$ ; *Number of Binding Sites*), wurde zuerst die Luziferaseaktivität einer bekannten Konzentration GpL<sub>(CT-LC)</sub>-18D1-IgG1 gemessen. Hieraus konnte im Folgenden die Luziferaseaktivität einer einzelnen GpL-Domäne ( $A_{GpL-Dom}$ ) abgeleitet werden. In Verbindung mit der Zellzahl pro well ( $ZN_{well}$ ) und der maximalen spezifischen Bindung ( $B_{max}$ ) des jeweiligen Experiments, wurde die durchschnittliche Anzahl an Fn14-Molekülen auf einer HT1080 Zelle unter Verwendung folgender Formel ausgerechnet:

$$N_{BS} = (B_{max} \times A_{GpL-Dom}) / ZN_{well}$$

### 3.9 IL8 ELISA

Zur Bestimmung der IL8-Konzentration nach Stimulation der WiDr Zellen mit den jeweiligen 18D1-Fusionsproteinen wurden  $2 \times 10^4$  Zellen in 96-*well* Platten (Triplikate) ausgesät und über Nacht in DMEM mit 10 % FCS kultiviert. Am nächsten Tag wurde das Medium der Zellen entfernt und frisches Medium zugegeben, welches mit den verschiedenen 18D1-Fusionsproteinen versetzt war sowie ohne und mit Protein G (1 µg/ml) oder den jeweiligen HEK293-Transfektanten ( $1,75 \times 10^4$  Zellen/*well*). Dabei ist zu beachten, dass die Kombinationen mit den 18D1-Fusionsproteinen immer eine halbe Stunde vorinkubiert wurden, bis sie zu den WiDr Zellen gegeben wurden. Die WiDr Zellen wurden über Nacht stimuliert und der IL8-Gehalt im Überstand am nächsten Tag mithilfe des „OptEIA Human IL-8 ELISA Kit“ bestimmt.

Für die Kokultur-Experimente mit E09-IgG1 und G28.5-IgG1 wurden HT1080-CD40 Zellen in 96-*well* Platten ausgesät ( $1,5 \times 10^4$  pro *well*, Triplikate) und über Nacht in RPMI 1640 Medium mit 10 % FCS kultiviert. Für die entsprechenden Versuche mit BHA10-IgG1 wurden HT29 Zellen verwendet ( $2 \times 10^4$  /*well*, 96-*well* Platte, Triplikate), die ebenfalls in RPMI 1640 Medium mit 10 % FCS kultiviert wurden. Der weitere Versuchsaufbau entspricht dem für die 18D1-Fusionsproteine beschriebenen. Einzige Veränderung ist, dass im Falle von E09-IgG1 20 µM des Caspase-Inhibitors zVAD-fmk zugegeben wurden, um die Induktion des Zelltods zu verhindern und zusätzlich 1 µg/ml CHX, um die CD95-induzierten Signalwege zu verstärken.

### 3.10 Zytotoxizitätsassay

Zur Vitalitätsbestimmung von Kym-1 Zellen nach Stimulation mit den verschiedenen 18D1-IgG1-Fusionsproteinen wurden  $2 \times 10^4$  Zellen/*well* in 96-*well* Platten ausgesät (Triplikate) und über Nacht in RPMI 1640 Medium mit 10 % FCS kultiviert. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel, wobei das frische Medium die jeweiligen 18D1-IgG1-Fusionsproteine enthielt und dazu entweder ohne oder mit 1 µg/ml Protein G versetzt war. Die Kym-1 Zellen wurden über Nacht stimuliert. Anschließend wurden die Überstände verworfen und 50 µl Kristallviolett-Lösung für 15 min bei Raumtemperatur hinzugegeben. Zum Entfernen der überschüssigen Kristallviolett-Lösung wurden die 96-*well* Platten dreimal in destilliertem

Wasser gewaschen und getrocknet. Abschließend wurden die Platten im „ELISA-Reader Lucy 2“ bei 595 nm analysiert.

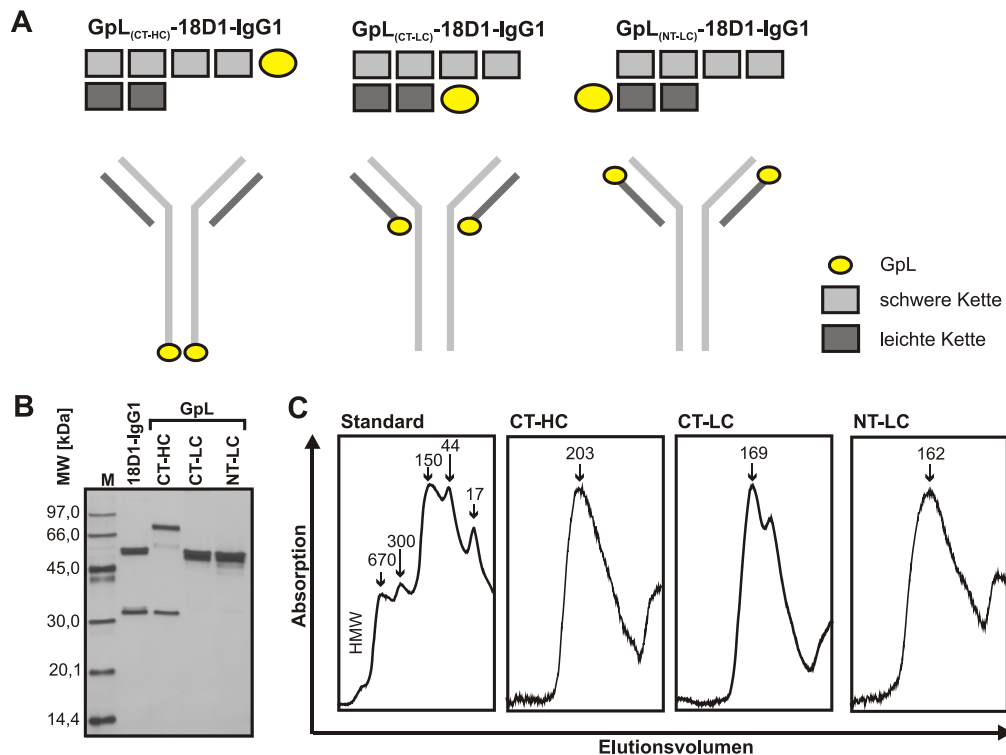
## 4. Ergebnisse

### 4.1 Charakterisierung von GpL-18D1-IgG1-Fusionsproteinen

#### 4.1.1. Konstruktion und Reinigung der 18D1-IgG1-Fusionsproteinen

Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass die genetische Fusion der *Gaussia princeps* Luziferase (GpL) an verschiedene Liganden der TNFSF zu keinen Veränderungen in den Trimerisierungseigenschaften oder den Rezeptorbindungseigenschaften dieser Moleküle führt (Bittner et al., 2016; Lang et al., 2016). Folglich konnten mit diesen Fusionsproteinen zelluläre Bindungsstudien zur Bestimmung der Affinität von Liganden der TNFSF zu ihren jeweiligen Rezeptoren durchgeführt werden. Dieser Ansatz sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf Antikörper übertragen werden, da die bisher angewandten Verfahren zur Untersuchung der Bindungseigenschaften von Antikörpern meist zellfreie Verfahren oder sehr aufwendig sind. Zunächst wurde der Fn14-spezifische IgG1-Antikörper 18D1 an insgesamt drei verschiedenen Positionen genetisch mit der *Gaussia princeps* Luziferase fusioniert. Anschließend wurden die Bindungseigenschaften der Fusionsproteine untersucht, wie auch deren funktionellen Eigenschaften und mit dem parentalen Antikörper 18D1-IgG1 verglichen, um zu evaluieren, welche Positionierung der Luziferase die Eigenschaften des Antikörpers am wenigsten beeinflusst. Im ersten Antikörper-Fusionsprotein wurde die Luziferase an das C-terminale Ende der schweren Kette kloniert (GpL<sub>(CT-HC)</sub>-18D1-IgG1), im zweiten an den C-Terminus der leichten Kette (GpL<sub>(CT-LC)</sub>-18D1-IgG1) und im dritten Antikörper-Fusionsprotein an das N-terminale Ende der leichten Kette (GpL<sub>(NT-LC)</sub>-18D1-IgG1) (Abb. 8-A). Zusätzlich enthalten alle drei GpL-18D1-IgG1-Fusionsproteine genau wie der parentale Antikörper 18D1-IgG1 einen FLAG-Tag. Durch diesen konnten die verschiedenen 18D1-IgG1-Fusionsproteine nach der Produktion in HEK293 Zellen mittels anti-FLAG-Affinitätschromatografie gereinigt werden. Die gereinigten Proteine wurden anschließend über eine SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Silberfärbung visualisiert, um die Konzentrationen zu bestimmen und die Reinheit der Fusionsproteine zu überprüfen (Abb. 8-B). Um sicherzustellen, dass die GpL-18D1-IgG1-Fusionsproteine keine Aggregate bilden, was sowohl die Bindungseigenschaften als auch die funktionellen Eigenschaften der Antikörper beeinflussen würde, wurden alle Antikörperpräparationen gefiltert. Durch den Vergleich mit

einem mitgeführten Standard konnte gezeigt werden, dass keines der GpL-Antikörper-Fusionsproteine Aggregate gebildet hat (Abb. 8-C).



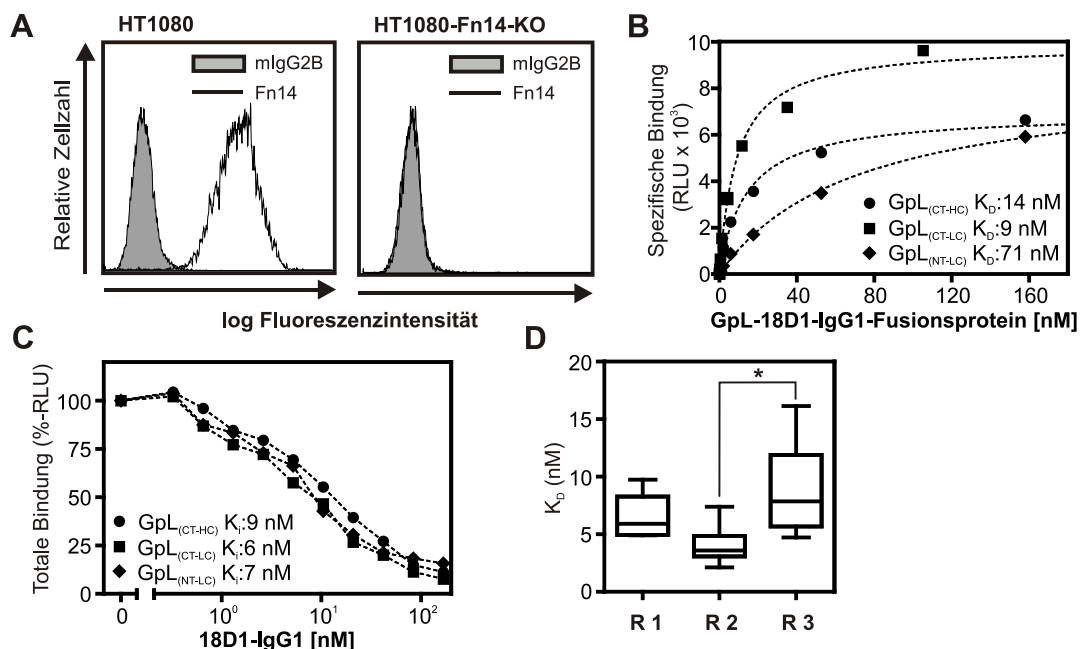
**Abbildung 8: Struktur und Reinigung der verschiedenen 18D1-Antikörper Fusionsproteine**

**(A)** Schematische Darstellung der analysierten Fn14-spezifischen GpL-18D1-IgG1-Fusionsproteine. **(B)** Je 200 ng der verschiedenen 18D1-IgG1-Fusionsproteine wurden nach anti-FLAG-Affinitätsreinigung über eine SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mittels Silberfärbung detektiert. **(C)** Gelfiltration der GpL-18D1-IgG1-Fusionsproteine mithilfe einer BioSep-SEC-S3000-Gelfiltrationssäule. kDa= Kilodalton, M= Marker, (H)MW= (*high*) molecular weight.

#### 4.1.2 Affinität der GpL-18D1-IgG1-Fusionsproteine für Fn14

Zur Untersuchung der Bindungseigenschaften der verschiedenen GpL-18D1-IgG1-Fusionsproteine an ihr Antigen Fn14 wurden Gleichgewichtsbindungsstudien auf HT1080 Zellen und HT1080-Fn14-KO Zellen durchgeführt. In Letzteren wurde die endogene Fn14-Expression mithilfe des CRISPR/Cas-Systems zerstört (Abb. 9-A). HT1080 und HT1080-Fn14-KO Zellen wurden paarweise mit den GpL-18D1-IgG1-Fusionsproteinen im Konzentrationsbereich von 0-160 nM inkubiert und nach dem Abwaschen der ungebundenen GpL-Antikörper-Fusionsproteine die zellassoziierte Luziferaseaktivität bestimmt. Durch den Abzug der unspezifischen (HT1080-Fn14-KO) von der totalen Bindung (HT1080) wurde die spezifische Bindung berechnet und über diese mithilfe des Programms GraphPad Prism 5.0 der  $K_D$ -Wert

des jeweiligen Fusionsproteins ermittelt (Abb. 9-B). Dabei zeigte sich, dass das  $\text{GpL}_{(\text{CT-LC})}$ -18D1-IgG1- und das  $\text{GpL}_{(\text{CT-HC})}$ -18D1-IgG1-Fusionsprotein eine sehr ähnlich hohe Affinität für Fn14 aufweisen ( $K_D$ -Wert 15 bzw. 17 nM, siehe Tab. 4), das  $\text{GpL}_{(\text{NT-LC})}$ -18D1-IgG1-Fusionsprotein hingegen eine deutliche niedrigere Affinität von 74 nM besitzt (Tab. 4). Um diese Affinitätswerte mit denen des parentalen Antikörpers 18D1-IgG1 vergleichen zu können, wurden homologe Konkurrenzexperimente auf HT1080 Zellen durchgeführt, d.h. die Zellen wurden mit ansteigenden Konzentrationen des parentalen Antikörpers 18D1-IgG1 bei gleichbleibender Konzentration des GpL-Fusionsproteins inkubiert (Abb. 9-C). Daraus ergab sich ein  $K_i$ -Wert ( $K_D$ -Wert des Kompetitors) von 5 nM für den nicht-markierten 18D1-IgG1-Antikörper für sein Antigen Fn14 (Tab. 4).



**Abbildung 9: Affinitätsbestimmung der verschiedenen 18D1-IgG1-Fusionsproteine für Fn14**

**(A)** FACS-Analyse von HT1080 und HT1080-Fn14-KO Zellen im Hinblick auf ihre Fn14-Expression. **(B)** Gleichgewichtsbindungsstudien der verschiedenen GpL-18D1-IgG1-Fusionsproteine. HT1080 und HT1080-Fn14-KO Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen der GpL-Antikörper-Fusionsproteine inkubiert. Nach Berechnung der spezifischen Bindung wurden die  $K_D$ -Werte mithilfe der Funktion „nicht-lineare Regression“ des Programms GraphPad Prism 5.0 bestimmt. **(C)** Homologe Konkurrenzexperimente zur Bestimmung des  $K_i$ -Wertes des parentalen, nicht-markierten Antikörpers 18D1-IgG1. HT1080 Zellen wurden mit einem Gemisch aus den angegebenen Konzentrationen des parentalen Antikörpers 18D1-IgG1 und 1,3 nM  $\text{GpL}_{(\text{CT-HC})}$ -, 0,5 nM  $\text{GpL}_{(\text{CT-LC})}$ - bzw. 1,3 nM  $\text{GpL}_{(\text{NT-LC})}$ -18D1-IgG1 inkubiert. Der  $K_i$ -Wert wurde mithilfe des Programms GraphPad Prism 5.0 und den  $K_D$ -Werten, die für die GpL-Antikörper-Fusionsproteine in B erhalten wurden, berechnet. Die Mittelwerte der einzelnen Versuche von B und C sind in Tab. 4 dargestellt. Es wurde je ein repräsentatives Experiment gezeigt **(D)**  $K_D$ -Werte der Fn14-Bindung dreier unabhängig voneinander produzierten und gereinigten Chargen an  $\text{GpL}_{(\text{CT-LC})}$ -18D1-IgG1 (R1-R3). Mit jeder Charge wurden wie in B beschrieben sechs Gleichgewichtsbindungsstudien durchgeführt und die erhaltenen  $K_D$ -Werte für jede Charge gemittelt. \* Signifikanter Unterschied nach Bonferroni-Test.

Die Ergebnisse der homologen Bindungsstudien und der Konkurrenzexperimente zeigen, dass die Positionierung der Luziferase am variablen Teil der leichten Kette die Bindungseigenschaften des 18D1-IgG1-Antikörpers an Fn14 negativ beeinflusst. Statistische Analysen mit dem Bonferroni-Test bestätigen, dass die ermittelten Differenzen der  $K_D$ -Werte signifikant unterschiedlich zum parentalen Antikörper 18D1-IgG1 sind. Die Positionierung der Luziferase am C-Terminus der leichten oder schweren Kette führt hingegen zu keinen signifikanten Unterschieden im Vergleich mit dem parentalen Antikörper (Tab. 4).

**Tabelle 4: Übersicht der  $K_D$ -Werte der 18D1-IgG1-Fusionsproteine für Fn14**

Interaktion	Anzahl der Versuche	Einzelne $K_D$ -Werte (nM)	Mittlerer $K_D$ (nM)
18D1-IgG1 – Fn14	11	6, 9, 4, 4, 6, 4, 3, 5, 4, 7, 2	$5 \pm 2$
GpL(CT-HC)-18D1-IgG1 – Fn14	4	14, 20, 22, 10	$17 \pm 6^a$
GpL(CT-LC)-18D1-IgG1 – Fn14	4	9, 17, 25, 9	$15 \pm 8^a$
GpL(NT-LC)-18D1-IgG1 – Fn14	4	71, 77, 98, 50	$74 \pm 20^b$

Alle möglichen Kombinationen der Antikörper wurden mit dem Bonferroni-Test analysiert.

<sup>a</sup> kein signifikanter Unterschied zum mittleren  $K_D$  von 18D1-IgG1

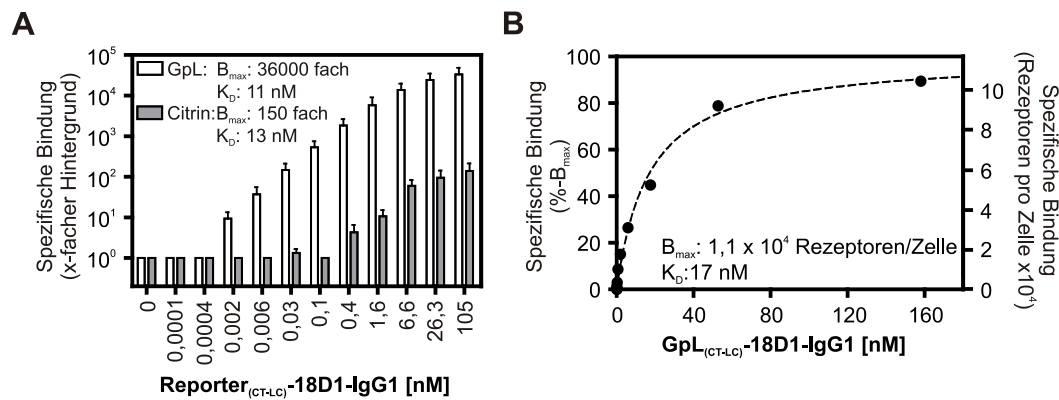
<sup>b</sup> signifikanter Unterschied zum mittleren  $K_D$  von 18D1-IgG1 ( $p < 0,001$ )

Für die Nutzung von GpL-Antikörper-Fusionsproteinen ist es wichtig, dass verschiedene Chargen/Reinigungen solcher Moleküle eine gleichbleibende Qualität aufweisen. Um dies zu überprüfen, wurde das GpL(CT-LC)-18D1-IgG1-Fusionsprotein dreimal unabhängig voneinander produziert und über anti-FLAG-Affinitätschromatographie gereinigt. Anschließend wurden Gleichgewichtsbindungsstudien auf HT1080 Zellen und HT1080-Fn14-KO Zellen wie zuvor beschrieben durchgeführt. Die durchschnittlich ermittelten  $K_D$ -Werte von Reinigung 1 (7 nM) und den Reinigungen 2 (4 nM) und 3 (9 nM) haben keine signifikanten Unterschiede zueinander aufgewiesen. Betrachtet man nur die beiden Reinigungen 2 und 3, war hier zwar ein signifikanter Unterschied erkennbar, dieser war jedoch gering (Abb. 9-D). Dies zeigt, dass verschiedene Chargen/Reinigungen des GpL(CT-LC)-18D1-IgG1-Fusionsproteins in ihren Eigenschaften nur sehr wenig variieren und eine sehr gute Reproduzierbarkeit aufweisen.



### 4.1.3 Vergleich der genetischen Fusion von GpL und Citrin an 18D1-IgG1

Die bisherigen Versuche haben gezeigt, dass die genetische Fusion der *Gaussia princeps* Luziferase an das C-terminale Ende der leichten Kette von 18D1-IgG1 die Bindungseigenschaften an Fn14 nicht negativ beeinflusst. Eine kürzlich erschienene Arbeit, die das Fluoreszenzprotein Citrin statt GpL zur Antikörpermarkierung verwendete, kam zu demselben Ergebnis (Haas et al., 2010). Es wurde deshalb im Folgenden untersucht, welche der beiden Markierungsdomänen sensitivere Bindungsstudien auf zellulärer Ebene erlaubt. Aus diesem Grund wurde analog zum GpL<sub>(CT-LC)</sub>-18D1-IgG1-Fusionsprotein ein Citrin<sub>(CT-LC)</sub>-18D1-IgG1-Fusionsprotein kloniert, produziert und gereinigt. Anschließend wurden mit beiden Konstrukten Gleichgewichtsbindungsstudien auf HT1080 Zellen und HT1080-Fn14-KO Zellen durchgeführt. Die gemittelten  $K_D$ -Werte aus drei parallel durchgeführten Versuchen zeigten erwartungsgemäß keinen signifikanten Unterschied zwischen dem GpL (11 nM) - und dem Citrin (13 nM) -18D1-IgG1-Fusionsprotein. Allerdings zeigten die beiden Proteine eine sehr unterschiedliche Sensitivität für die Fn14-Bindung. So konnte bei gleicher Zellzahl (ca. 200.000) eine spezifische Bindung des GpL-18D1-IgG1-Fusionsproteins bereits bei einer Konzentration von 0,002 nM detektiert werden, während dies bei dem Citrin-18D1-IgG1-Fusionsprotein erst bei 0,4 nM möglich war. Auch im Signal-Rausch-Verhältnis zeigte sich ein deutlicher Unterschied. So war das Maximalsignal ( $B_{max}$ , komplette Rezeptorbelegung) im Fall des Citrin-Fusionsproteins 150-fach höher als das Hintergrundsignal, für das GpL-Fusionsprotein hingegen wurde ein Signal-Rausch-Verhältnis von 36.000 erhalten und somit eine über 200-fach höhere Sensitivität im Vergleich zum Citrin-Fusionsprotein (Abb. 10-A). In Abbildung 10-B ist eine weitere Gleichgewichtsbindungsstudie des GpL<sub>(CT-LC)</sub>-18D1-IgG1-Fusionsproteins an Fn14 dargestellt. Die y-Achsen zeigen hier allerdings nicht die spezifische Bindung in RLU sondern die spezifische Bindung in %- $B_{max}$  bzw. in belegte Rezeptoren pro Zelle. Betrachtet man die Anzahl an belegten Rezeptoren pro Zelle bei einer Konzentration von 0,002 nM des GpL-Fusionsproteins, also der Konzentration, bei der erstmals eine spezifische Bindung detektiert werden konnte, so sind nur 0,025 % (= ca.  $1,1 \times 10^5$  Rezeptoren pro Zelle) der Rezeptoren einer Zelle belegt (Abb. 10-A). Diese Versuche zeigen, dass die genetische Fusion der *Gaussia princeps* Luziferase an Antikörper eine deutlich sensitivere Methode darstellt als die Fusion mit Citrin.

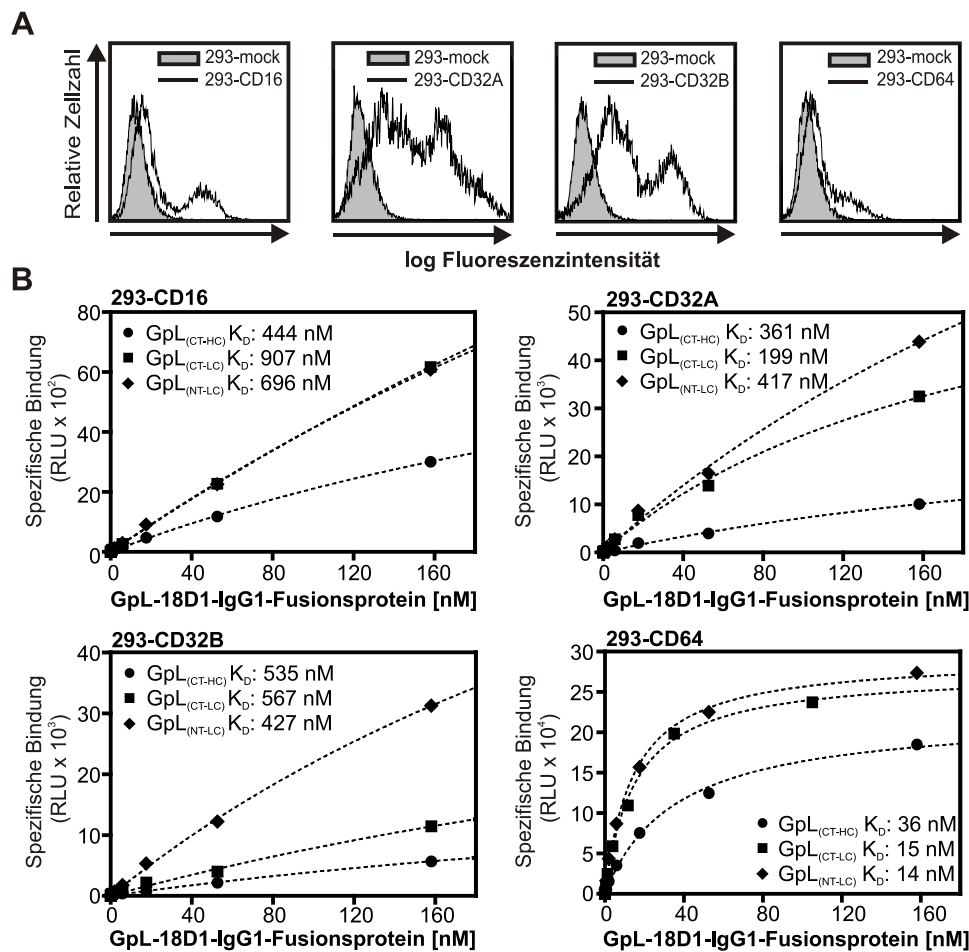


**Abbildung 10: Vergleichende Gleichgewichtsbindungsstudien mit GpL<sub>(CT-LC)</sub>- und Citrin<sub>(CT-LC)</sub>-18D1-IgG1**

**(A)** HT1080 und HT1080-Fn14-KO Zellen wurden paarweise mit den angegebenen Konzentrationen der beiden Fusionsproteine inkubiert. Nach Berechnung der spezifischen Bindung wurden die  $K_D$ -Werte mithilfe der Funktion „nicht-lineare Regression“ des Programms GraphPad Prism 5.0 bestimmt. Die Bindungsdaten von drei unabhängigen Versuchen wurden gemittelt und sind als x-facher Anstieg des Hintergrunds dargestellt. **(B)** Gleichgewichtsbindungsstudie des GpL<sub>(CT-LC)</sub>-18D1-IgG1-Fusionsproteins an HT1080 und HT1080-Fn14-KO Zellen. Durchführung wie in A beschrieben. Die Spezifische Bindung ist sowohl in Prozent von  $B_{max}$  angegeben (linke y-Achse) als auch in belegte Rezeptoren pro Zelle (rechte y-Achse).

#### 4.1.4 Affinität der GpL-18D1-IgG1-Fusionsproteine für Fc $\gamma$ -Rezeptoren

Antikörper interagieren im Rahmen einer Immunantwort nicht nur mit ihrem spezifischen Antigen sondern wie bereits beschrieben auch mit Fc $\gamma$ -Rezeptoren, um beispielsweise verschiedene Effektorfunktionen des Immunsystems zu aktivieren. Aus diesem Grund wurden ebenfalls die Bindungseigenschaften der GpL-18D1-IgG1-Fusionsproteine gegenüber einer Auswahl an Fc $\gamma$ R untersucht. Hierfür wurden HEK293 Zellen transient mit Fc $\gamma$ R-kodierenden Expressionsplasmiden transfiziert und die Expression mittels FACS-Analysen überprüft (Abb. 11-A). Anschließend wurden Gleichgewichtsbindungsstudien durchgeführt. Dabei wurden die Fc $\gamma$ R-exprimierenden Zellen und mock-transfizierte Kontrollzellen paarweise mit ansteigenden Konzentrationen der GpL-18D1-IgG1-Fusionsproteine inkubiert. Die  $K_D$ -Werte wurden wiederum über die spezifische Bindung mithilfe des Programms GraphPad Prism 5.0 bestimmt. Die statistische Analyse der ermittelten  $K_D$ -Werte der verschiedenen GpL-18D1-IgG1-Fusionsproteine für die mäßig bis schwach affinen Fc $\gamma$ R CD16, CD32A und CD32B erbrachte dabei keine signifikanten Unterschiede. Die  $K_D$ -Werte für den hoch-affinen Fc $\gamma$ R CD64 zeigten eine marginal geringere Affinität des GpL<sub>(CT-HC)</sub>-18D1-IgG1-Fusionsproteins im Vergleich zu den beiden anderen GpL-Antikörper-Fusionsproteinen (Abb. 11-B und Tab. 5).

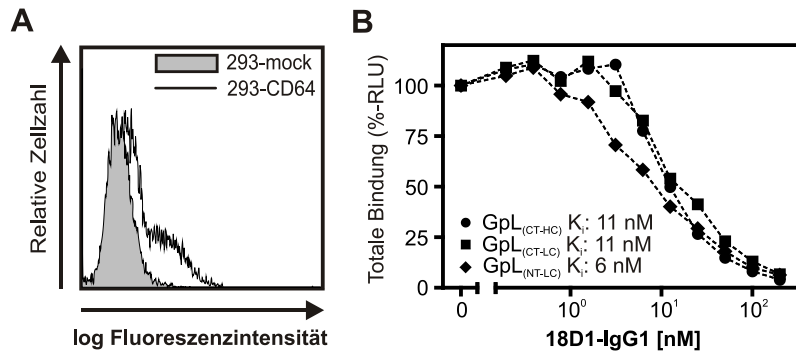


**Abbildung 11: Fc $\gamma$ -Rezeptor-Bindung verschiedener GpL-18D1-IgG1-Fusionsproteine**

(A) HEK293 Zellen wurden transient mit humanen Fc $\gamma$ R (CD16, CD32A, CD32B bzw. CD64)- kodierenden Expressionsplasmiden transfiziert und die Expression durch FACS-Analyse überprüft. (B) Zur Bestimmung der Affinität der GpL-18D1-IgG1-Fusionsproteine für die humanen Fc $\gamma$ -Rezeptoren wurden Gleichgewichtsbindungsstudien durchgeführt. Hierfür wurden mock-transfizierte HEK293 Zellen und HEK293 Zellen, die die verschiedenen Fc $\gamma$ R transient exprimierten, verwendet. Nach Berechnung der spezifischen Bindung wurden mithilfe der Funktion „nicht-lineare Regression“ des Programms GraphPad Prism 5.0 die  $K_D$ -Werte der GpL-18D1-IgG1-Fusionsproteine bestimmt. Ein beispielhaftes Experiment ist gezeigt. Die aus mehreren Versuchen kalkulierten Durchschnittswerte sind in Tabelle 5 angegeben.

Um die  $K_D$ -Werte der GpL-18D1-IgG1-Fusionsproteine mit denen des parentalen Antikörpers vergleichen zu können, d.h., um einen möglichen Einfluss der GpL-Domäne auf die Fc $\gamma$ R-Bindung feststellen zu können, wurden homologe Konkurrenzexperimente mit dem hochaffinen Fc $\gamma$ R CD64 durchgeführt. Hierfür wurden wiederum HEK293 Zellen transient mit einem CD64-kodierenden Expressionsplasmid transfiziert. Nach Kontrolle der CD64-Expression mittels FACS-Analyse (Abb. 12-A), wurden die Transfektanten mit ansteigenden Konzentrationen des parentalen 18D1-IgG1-Antikörpers inkubiert bei konstanter Zugabe der

verschiedenen GpL-Antikörper-Fusionsproteine. Für den parentalen Antikörper ergab sich daraus ein  $K_i$ -Wert von 8 nM (Abb. 12-B und Tab. 5). Dieser Wert ist vergleichbar mit den ermittelten  $K_D$ -Werten der GpL-18D1-IgG1-Fusionsproteine, wobei die GpL-Positionierung am C-Terminus der schweren Kette zu statistisch signifikanten Unterschieden führte und somit insgesamt die schwächste Affinität für CD64 zeigte (Tab. 5).



**Abbildung 12: Homologe Konkurrenzexperimente zur Affinitätsbestimmung des parentalen Antikörpers 18D1-IgG1 für CD64**

(A) FACS-Analyse von HEK293 Zellen, die transient mit einem CD64-kodierenden Expressionsplasmid transfiziert wurden. (B) HEK293-CD64 Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen des parentalen Antikörpers 18D1-IgG1 in Kombination mit GpL<sub>(CT-HC)</sub>-, GpL<sub>(CT-LC)</sub>- oder GpL<sub>(NT-LC)</sub>-18D1-IgG1 (je 39 pM) inkubiert. Nach dem Entfernen der ungebundenen 18D1-Fusionsproteine wurde die zellassozierte Luziferaseaktivität gemessen. Der  $K_i$ -Wert wurde mithilfe des Programms GraphPad Prism 5.0 berechnet unter Berücksichtigung der  $K_D$ -Werte, die für die GpL-Fusionsproteine zuvor erhalten wurden. Die Mittelwerte aller durchgeführten Versuche sind in Tabelle 5 angegeben. Es ist ein repräsentatives Experiment gezeigt.

Zusammenfassend zeigen die durchgeführten Bindungsstudien, dass alle drei generierten GpL-18D1-IgG1-Fusionsproteine eine effiziente Bindung an das Antigen Fn14 wie auch an die humanen Fc $\gamma$ -Rezeptoren ermöglichen. Im Hinblick auf die Fn14-Bindung ist die Affinität allerdings vermindert, wenn die Luziferase am variablen Ende der leichten Kette positioniert wird. Befindet sich die Luziferase am C-Terminus der leichten oder schweren Kette, konnte weder bei der Fn14- noch bei der Fc $\gamma$ R-Bindung ein deutlicher Unterschied der Affinität festgestellt werden. Vergleicht man die hier bestimmten  $K_D$ -Werte der GpL-18D1-IgG1-Fusionsproteine für die verschiedenen Fc $\gamma$ -Rezeptoren mit den in der Literatur zu findenden Angaben für IgG1-Antikörper, so lässt sich eine sehr gute Übereinstimmung für CD16, CD32A und CD64 feststellen. Einzig für CD32B gehen die Werte deutlich auseinander, wobei die Literaturangaben, basierend auf zellfreien Analysen, eine wesentlich niedrigere Affinität von IgG1-Antikörpern an CD32B zeigen (Tab. 5).

Tabelle 5: Übersicht der  $K_D$ -Werte der GpL-18D1-IgG1-Fusionsproteine und 18D1-IgG1 für die humanen Fc $\gamma$ -Rezeptoren

Interaktion	Anzahl der Versuche	Einzelne $K_D$ - Werte (nM)	Mittlerer $K_D$ (nM)	$K_D$ für Fc $\gamma$ R-IgG1 Interaktion laut Literatur (nM)
18D1-IgG1 – CD64	10	6, 14, 11, 3, 12, 11, 4, 4, 11, 6	$8 \pm 4$	1 – 20 <sup>(f, g)</sup>
GpL(CT-HC)-18D1-IgG1 – CD64	4	42, 36, 22, 25	$31 \pm 10^a$	
GpL(CT-LC)-18D1-IgG1 – CD64	6	21, 15, 8, 11, 21, 24	$17 \pm 6^b$	
GpL(NT-LC)-18D1-IgG1 – CD64	4	17, 14, 10, 33	$19 \pm 10^b$	
IgG1 – CD32A				190-6000 <sup>(f, g)</sup>
GpL(CT-HC)-18D1-IgG1 – CD32A	5	642, 194, 261, 360, 455	$383 \pm 175^c$	
GpL(CT-LC)-18D1-IgG1 – CD32A	6	241, 348, 172, 678, 199, 129	$295 \pm 202^c$	
GpL(NT-LC)-18D1-IgG1 – CD32A	6	97, 126, 515, 417, 243, 201	$266 \pm 166^c$	
IgG1 – CD32B				8300-10000 <sup>(g, h)</sup>
GpL(CT-HC)-18D1-IgG1 – CD32B	4	534, 264, 934, 890	$656 \pm 317^d$	
GpL(CT-LC)-18D1-IgG1 – CD32B	5	568, 874, 302, 483, 658	$577 \pm 212^d$	
GpL(NT-LC)-18D1-IgG1 – CD32B	4	426, 753, 538, 847	$641 \pm 193^d$	
IgG1 – CD16				440-9000 <sup>(f, g)</sup>
GpL(CT-HC)-18D1-IgG1 – CD16	3	444, 230, 2177	$950 \pm 1068^e$	
GpL(CT-LC)-18D1-IgG1 – CD16	3	907, 114, 1106	$709 \pm 525^e$	
GpL(NT-LC)-18D1-IgG1 – CD16	4	696, 271, 572, 1361	$725 \pm 460^e$	

Die Datensätze für CD64, CD32A, CD32B und CD16 wurden einzeln betrachtet und statistisch mit dem Bonferroni-Test analysiert.

<sup>a</sup> signifikanter Unterschied im Vergleich zum  $K_D$  von 18D1-IgG1 an CD64 ( $p < 0.001$ )

<sup>b</sup> kein signifikanter Unterschied im Vergleich zum  $K_D$  von 18D1-IgG1 an CD64

<sup>c</sup> kein signifikanter Unterschied der CD32A-Bindung

<sup>d</sup> kein signifikanter Unterschied der CD32B-Bindung

<sup>e</sup> kein signifikanter Unterschied der CD16-Bindung

<sup>f</sup> (Luo et al., 2009)

<sup>g</sup> (Vafa et al., 2014)

<sup>h</sup> (Bruhns and Jonsson, 2015)

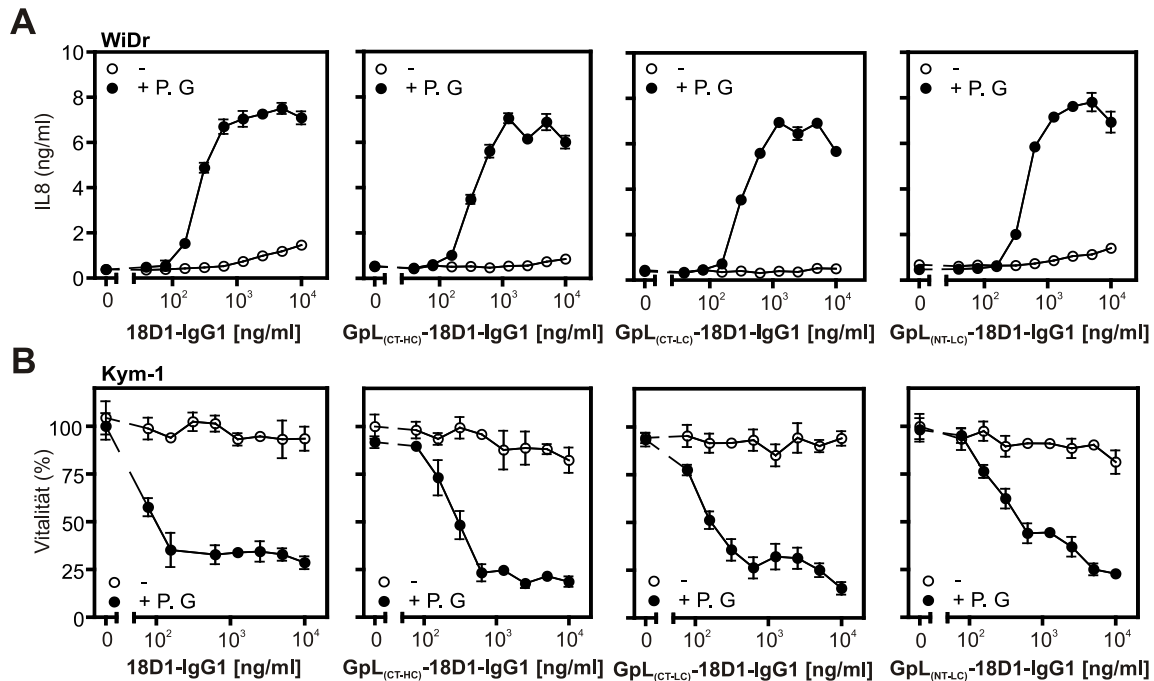
#### **4.1.5 GpL-Fusionierung an 18D1-IgG1 hat keinen Einfluss auf die agonistische Aktivität der Antikörper nach Oligomerisierung oder FcγR-Bindung**

Verschiedene Antikörper, die gegen Mitglieder der TNFRSF gerichtet sind, befinden sich zurzeit in präklinischen oder klinischen Studien. Für einige dieser Antikörper wurde nachgewiesen, dass sie erst dann als effektive Agonist wirken, wenn sie oligomerisiert vorliegen oder an Fcγ-Rezeptoren gebunden haben (Aggarwal et al., 2012). Dies lässt sich darauf zurückführen, dass für die Aktivierung bestimmter Rezeptoren der TNFRSF, inklusive des Fn14-Moleküls, eine sekundäre Aggregation der initial gebildeten Rezeptor-Liganden-Komplexe bzw. Rezeptor-Antikörper-Komplexe notwendig ist (siehe 1.1.4). Aus diesem Grund war es von großer Bedeutung zu evaluieren, ob die genetische Fusion der *Gaussia princeps* Luziferase an die verschiedenen Positionen des 18D1-IgG1-Antikörpers dessen funktionelle Eigenschaften beeinflusst.

In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass der Fn14-spezifische 18D1-IgG1-Antikörper ohne Oligomerisierung keine robuste Aktivierung des klassischen NFκB-Signalwegs induziert und entsprechend keine oder nur eine marginale Produktion des NFκB-regulierten Zytokins IL8 in Zellen hervorruft. In Anwesenheit von Protein G wird hingegen eine starke IL8-Induktion detektiert (Trebing et al., 2014). In der vorliegenden Arbeit konnte ein analoges Verhalten für die verschiedenen GpL-18D1-IgG1-Fusionsproteine gezeigt werden (Abb. 13-A). Hierfür wurden WiDr Zellen in An- und Abwesenheit von 1 µg/ml Protein G über Nacht mit ansteigenden Konzentrationen der 18D1-IgG1-Fusionsproteine stimuliert. Am nächsten Morgen wurde der IL8-Gehalt im Überstand mittels ELISA bestimmt. Keines der untersuchten GpL-Antikörper-Fusionsproteine zeigte eine nennenswerte agonistische Aktivität auf WiDr Zellen ohne Oligomerisierung. Nach Oligomerisierung der Antikörper mit Protein G konnte hingegen eine effiziente IL8-Induktion mittels ELISA detektiert werden. Dabei waren sowohl die maximale IL8-Induktion nach Oligomerisierung sowie das Dosis-Wirkungs-Verhältnis der untersuchten GpL-18D1-IgG1-Fusionsproteine mit dem parentalen 18D1-IgG1-Antikörper vergleichbar.

Auf Kym-1 Zellen führte die Aktivierung von Fn14 durch oligomerisierten 18D1-IgG1 zum Zelltod, wohingegen ohne Oligomerisierung kein Effekt des Antikörpers auf die Vitalität der

Zellen zu erkennen war (Abb. 13-B, (Trebing et al., 2014)). Dies beruht auf dem in der Einleitung beschriebenen Effekt, dass eine Fn14-Aktivierung zur TNF-Induktion über den NF $\kappa$ B-Signalweg führen kann. TNF wiederum induziert anschließend über den Todesrezeptor TNFR1 Apoptose in Kym-1 Zellen (Wajant, 2013). Die hier untersuchten GpL-18D1-IgG1-Fusionsproteine zeigten auch hinsichtlich dieser Eigenschaft keinen Unterschied zu dem parentalen Fn14-Antikörper (Abb. 13-B).



**Abbildung 13: Agonistische Aktivität der 18D1-IgG1-Fusionsproteine nach Protein G-Oligomerisierung**

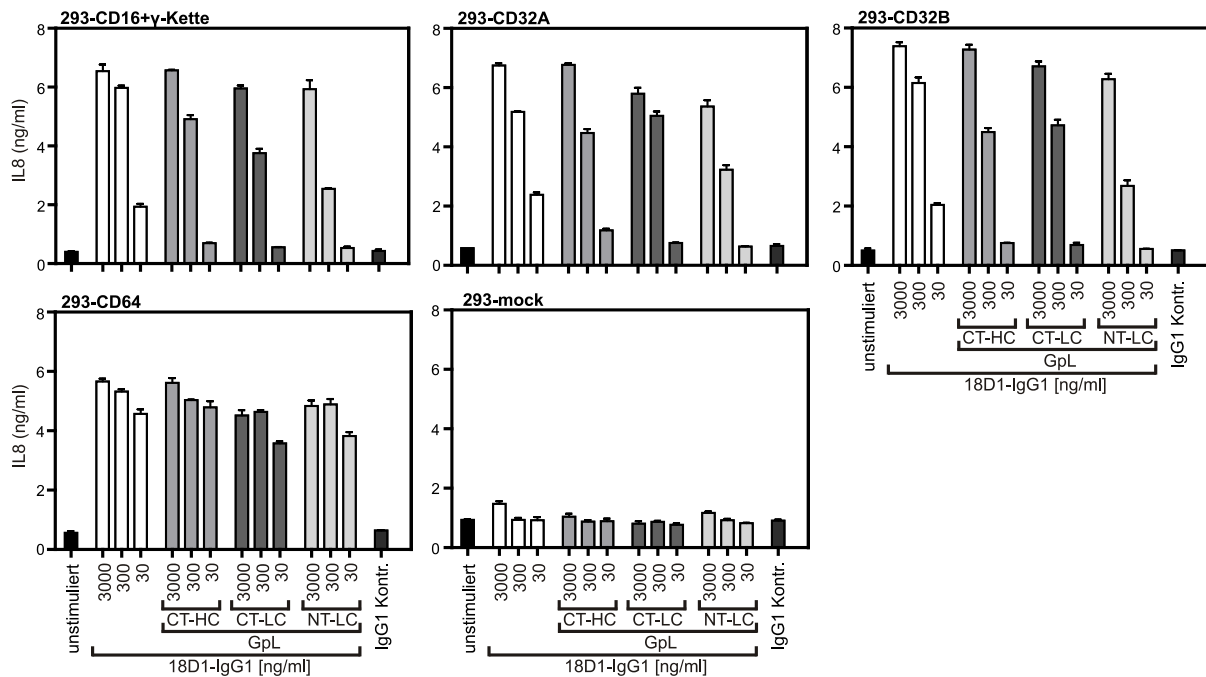
WiDr Zellen (**A**) bzw. Kym-1 Zellen (**B**) wurden in 96-well Platten ausgesät und mit den angegebenen Konzentrationen der verschiedenen 18D1-IgG1-Fusionsproteine in An- oder Abwesenheit von 1  $\mu$ g/ml Protein G (P. G) über Nacht stimuliert. Am nächsten Tag wurde die IL8-Konzentration im Überstand der WiDr Zellen mittels ELISA gemessen (**A**) bzw. die Vitalität der Kym-1 Zellen über Kristallviolett-Färbung bestimmt (**B**).

In potentiellen *in vivo*-Anwendungen erfolgt die Oligomerisierung des 18D1-IgG1-Antikörpers oder auch anderer TNFRSF-spezifischer-Antikörper natürlicherweise nicht über Protein G. Stattdessen werden die Antikörper über die Bindung an Fc $\gamma$ -Rezeptoren in effiziente Agonisten überführt. Um zu überprüfen, ob die GpL-18D1-IgG1-Fusionsproteine auch nach Fc $\gamma$ R-Bindung gleiche funktionelle Eigenschaften zeigen wie der parentale Antikörper 18D1, wurden Kokultur-Versuche durchgeführt. Hierfür wurden HEK293 Zellen transient mit Fc $\gamma$ R (CD16, CD32A, CD32B und CD64)-kodierenden Expressionsplasmiden transfiziert. Als Kontrolle wurden mock-transfizierte Zellen eingesetzt. Die Transfektanten wurden mit

verschiedenen Konzentrationen der jeweiligen GpL-18D1-IgG1-Fusionsproteine vorinkubiert und anschließend über Nacht zu WiDr Zellen gegeben. Am nächsten Morgen wurde der IL8-Gehalt im Überstand mittels ELISA bestimmt. In Kokulturen mit mock-transfizierten HEK293 Zellen konnte für keines der untersuchten GpL-18D1-IgG1-Fusionsproteine eine IL8-Induktion detektiert werden, was bestätigte, dass der Fn14-spezifische Antikörper 18D1 ohne Oligomerisierung praktisch keine agonistische Aktivität besitzt. Die Kokultur-Versuche mit den verschiedenen FcγR-exprimierenden HEK293 Zellen zeigten, dass eine Bindung an diese alle GpL-18D1-IgG1-Fusionsproteine in potente Agonisten überführt (Abb. 14). Die maximale IL8-Induktion war dabei innerhalb der verschiedenen FcγR-Kokulturen für alle GpL-18D1-IgG1-Varianten gleich, auch im Vergleich mit dem parentalen 18D1-IgG1-Antikörper. Ebenfalls war die Effizienz der IL8-Induktion durch die untersuchten Antikörper-Fusionsproteine für jeweils einen FcγR-Typ vergleichbar. Der Kokultur-Versuch verdeutlichte zudem, dass der FcγR CD64 ein hoch-affiner Rezeptor für die diversen IgG1-Varianten ist, da er im Gegensatz zu den anderen untersuchten Rezeptoren selbst bei den geringsten eingesetzten Konzentrationen der GpL-18D1-IgG1-Fusionsproteine noch eine nahezu maximale IL8-Induktion hervorrufen konnte.

Zusammenfassend betrachtet, sind alle hier untersuchten GpL-18D1-IgG1-Fusionsproteine im Hinblick auf Fn14- bzw. FcγR-Bindung wie auch der agonistischen Eigenschaften grundsätzlich funktionell. Gleichgewichtsbindungsstudien an Fn14 haben jedoch gezeigt, dass die Affinität signifikant vermindert ist, wenn die Luziferase am N-Terminus der leichten Kette positioniert wird, sodass eine Positionierung der Luziferase am C-Terminus der leichten oder schweren Kette präferiert wird. Für die nachfolgenden Versuche wurden daher Antikörperformate gewählt, bei denen sich die Luziferase am C-Terminus der leichten Kette befindet (CT-LC).





**Abbildung 14: Fc $\gamma$ R-Bindung überführt 18D1-IgG1-Fusionsproteine in potente Agonisten**

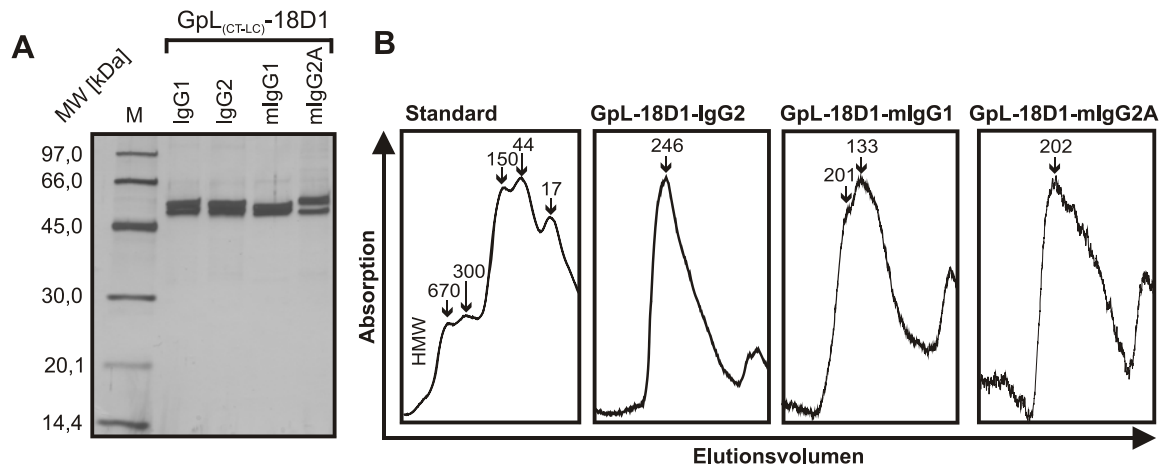
HEK293 Zellen wurden transient mit Fc $\gamma$ R-kodierenden Expressionsplasmiden bzw. einem Levektor (mock) transfiziert. Nach zwei Tagen wurden die Zellen geerntet und mit den angegebenen Konzentrationen an 18D1-IgG1-Fusionsproteinen für 30 min vorinkubiert. Anschließend wurde dieser Mix zu bereits am Vortag in 96-well Platten ausgesäten WiDr Zellen gegeben. Am nächsten Tag wurde der IL8-Gehalt im Überstand mittels ELISA bestimmt.

## 4.2 Charakterisierung verschiedener GpL<sub>(CT-LC)</sub>-18D1-Isotyp-Varianten

### 4.2.1 Reinigung und Gelfiltration der GpL<sub>(CT-LC)</sub>-18D1-Isotyp-Varianten

Im diagnostischen und therapeutischen Bereich finden nicht nur humane IgG1-Antikörper Einsatz, die spezifisch Mitglieder der TNFRSF binden, sondern beispielsweise auch humane IgG2- oder murine IgG1- und IgG2A-Antikörper. Gemein ist den genannten Isotypen, dass sie alle Dimere bilden. Dabei unterscheiden sich die Antikörper allerdings in der Anzahl und Anordnung der Disulfidbrücken. Aus diesem Grund wurde im Folgenden untersucht, ob auch bei diesen Isotypen die Fusion der *Gaussia princeps* Luziferase an das C-terminale Ende der leichten Kette zu keiner Einschränkung der Bindungseigenschaften sowie den funktionellen Eigenschaften führt. Hierfür wurden die drei folgenden GpL-18D1-Fusionsproteine generiert: GpL<sub>(CT-LC)</sub>-18D1-IgG2, GpL<sub>(CT-LC)</sub>-18D1-mIgG1 und GpL<sub>(CT-LC)</sub>-18D1-mIgG2A. Wie auch die bereits zuvor untersuchten Fusionsproteine enthielten diese Konstrukte ein FLAG-Epitop, das zur Reinigung der Proteine mittels anti-FLAG-Affinitätschromatographie diente. Im Anschluss

wurden die Fusionsproteine mit einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und Silber-gefärbt, um die Konzentration der Konstrukte zu bestimmen und die Reinheit der Reinigungen zu überprüfen (Abb. 15-A). Zusätzlich wurde mittels Gelfiltration kontrolliert, dass die verschiedenen GpL-Fusionsproteine keine Aggregate bilden (Abb. 15-B).

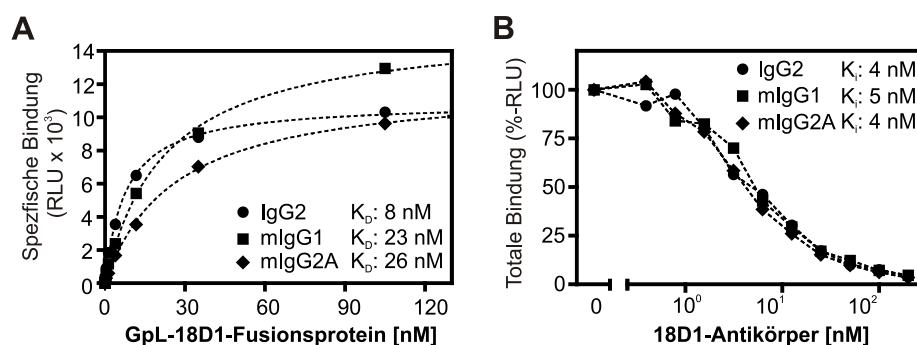


**Abbildung 15: Reinigung und Gelfiltration der verschiedenen GpL<sub>(CT-LC)</sub>-18D1-Isotyp-Varianten**

(A) 200 ng der jeweiligen GpL<sub>(CT-LC)</sub>-18D1-Fusionsproteine wurden nach anti-FLAG Affinitätsreinigung über eine SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mittels Silberfärbung detektiert. (B) Gelfiltration der GpL<sub>(CT-LC)</sub>-18D1-Fusionsproteine mithilfe einer BioSep-SEC-S3000-Gelfiltrationssäule. kDa= Kilodalton, M= Marker, (H)MW= (high) molecular weight.

#### 4.2.2 Affinität der neuen GpL<sub>(CT-LC)</sub>-18D1-Isotypen für Fn14 und Fcγ-Rezeptoren

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten der verschiedenen GpL<sub>(CT-LC)</sub>-18D1-Isotyp-Varianten an Fn14 wurden Gleichgewichtsbindungsstudien auf HT1080 und HT1080-Fn14-KO Zellen durchgeführt. Dabei wurden die beiden Zelltypen paarweise mit ansteigenden Konzentrationen der GpL-Fusionsproteine inkubiert und nach dem Abwaschen der ungebundenen GpL-Fusionsproteine die zellassoziierte Luziferaseaktivität gemessen. Die  $K_D$ -Werte der GpL-18D1-Antikörper wurden mithilfe der spezifischen Bindung über das Programm GraphPad Prism 5.0 ermittelt. Die  $K_D$ -Werte der IgG2- (10 nM), mIgG1- (34 nM) und mIgG2A-18D1-GpL<sub>(CT-LC)</sub>-Antikörper (31 nM) waren erwartungsgemäß vergleichbar mit dem des bereits charakterisierten GpL<sub>(CT-LC)</sub>-18D1-IgG1-Fusionsproteins (15 nM) (Abb. 9-B und 16-A, Tab. 4 und 6).



**Abbildung 16: Affinitätsbestimmung verschiedener 18D1-Isotyp-Varianten für Fn14 auf HT1080 Zellen**

**(A)** Gleichgewichtsbindungsstudien der GpL<sub>(CT-LC)</sub>-18D1-Isotyp-Varianten. HT1080 und HT1080-Fn14-KO Zellen wurden mit den angegebenen GpL<sub>(CT-LC)</sub>-Antikörpern inkubiert. Nach Berechnung der spezifischen Bindung wurden die K<sub>D</sub>-Werte mithilfe der Funktion „nicht-lineare Regression“ des Programms GraphPad Prism 5.0 bestimmt. **(B)** Homologe Konkurrenzexperimente zur Bestimmung der K<sub>i</sub>-Werte der parentalen, nicht-markierten Antikörper-Isotyp-Varianten von 18D1 an Fn14. HT1080 Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen der parentalen Antikörper von 18D1 inkubiert bei gleichzeitiger Zugabe von konstant 530 pM des jeweiligen GpL-Fusionsproteins. Die K<sub>i</sub>-Werte wurden über die in A bestimmte Affinität des GpL-markierten Antikörpers (K<sub>D</sub>) und das Programm GraphPad Prism 5.0 angenähert. Die Mittelwerte der durchgeführten Versuche von A und B sind in Tabelle 6 dargestellt. Es ist je ein repräsentatives Experiment gezeigt.

Im nächsten Schritt wurden homologe Konkurrenzexperimente auf HT1080 Zellen zur Bestimmung der Affinität der parentalen, nicht-markierten Antikörper-Isotyp-Varianten von 18D1 für Fn14 durchgeführt (Abb. 16-B). Die ermittelten K<sub>i</sub>-Werte stimmten sehr gut mit dem K<sub>i</sub>-Wert des 18D1-IgG1 Antikörpers überein. Im Vergleich zu den verschiedenen GpL-markierten 18D1-Isotyp-Varianten konnte kein signifikanter Unterschied der Affinität festgestellt werden. Lediglich das GpL<sub>(CT-LC)</sub>-18D1-mIgG1-Fusionsprotein zeigte eine schwach, jedoch signifikant verminderte Affinität (Tab. 6).

**Tabelle 6: Übersicht der K<sub>D</sub>-Werte der verschiedenen GpL<sub>(CT-LC)</sub>-18D1-Isotypen an Fn14**

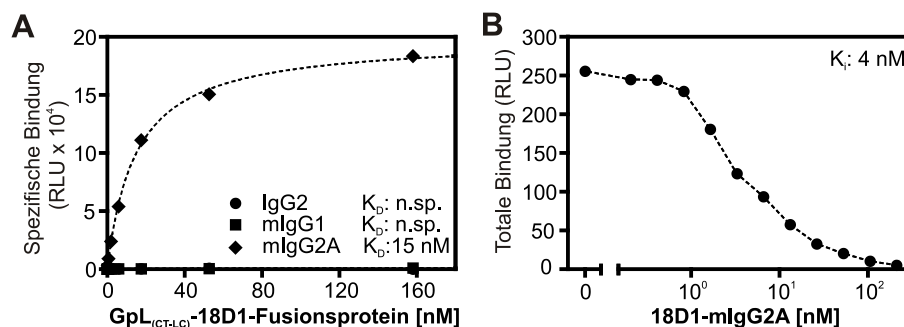
Interaktion	Anzahl der Versuche	Einzelne K <sub>D</sub> -Werte (nM)	Mittlerer K <sub>D</sub> (nM)
18D1-IgG2 – Fn14	3	5, 4, 4	4 ± 1
GpL(CT-LC)-18D1-IgG2 – Fn14	4	6, 8, 14, 10	10 ± 3
18D1-mIgG1 – Fn14	3	4, 5, 5	5 ± 1
GpL(CT-LC)-18D1-mIgG1 – Fn14	4	23, 22, 64, 27	34 ± 20 <sup>a</sup>
18D1-mIgG2A – Fn14	3	5, 4, 5	5 ± 1
GpL(CT-LC)-18D1-mIgG2A – Fn14	4	26, 19, 47, 30	31 ± 12

Alle möglichen Kombinationen der Antikörper wurden mit dem Bonferroni-Test analysiert.

<sup>a</sup> signifikanter Unterschied zum mittleren K<sub>D</sub> von 18D1-IgG2, 18D1-mIgG1 und m18D1-IgG2A

(p < 0,05)

Wie für die GpL-Varianten des 18D1-IgG1-Antikörpers, wurde auch für die neu-generierten Isotypen der 18D1-Antikörper die Affinität für verschiedene Fc $\gamma$ -Rezeptoren bestimmt. Die  $K_D$ -Werte der GpL-18D1-Antikörper wurden mithilfe von Gleichgewichtsbindungsstudien an transient transfizierten HEK293 Zellen ermittelt. In Abbildung 17-A ist dies beispielhaft für den Fc $\gamma$ R CD64 dargestellt, die Daten für die Fc $\gamma$ R CD16, CD32A und CD32B sind in Tabelle 7 aufgeführt. Die Versuche zeigten, dass sowohl das IgG2- wie auch das mIgG1-18D1-GpL-Fusionsprotein nicht an CD64 binden. Auch Literaturangaben bestätigen, dass IgG2-Antikörper nicht bzw. nur mit einer sehr geringen Affinität mit dem für IgG1 hoch affinen Fc $\gamma$ R CD64 interagieren (Tab. 7) (Bruhns and Jonsson, 2015; Vafa et al., 2014). Das GpL-18D1-mIgG2A-Fusionsprotein hingegen interagiert mit CD64 mit einer Affinität von 15 nM (Abb. 17-A). Im Anschluss an die Gleichgewichtsbindungsstudien wurden homologe Konkurrenzexperimente an HEK293-CD64 Zellen durchgeführt, zur Bestimmung der Affinität des parentalen, nicht-markierten Antikörpers 18D1-mIgG2A (Abb. 17-B). Der durchschnittliche  $K_i$ -Wert betrug 6 nM und lag statistisch signifikant etwas niedriger aber noch immer in guter Übereinstimmung mit dem  $K_D$ -Wert des GpL-mIgG2A-18D1-Fusionsproteins.



**Abbildung 17: Affinitätsbestimmung verschiedener 18D1-Isotyp-Varianten für CD64**

**(A)** Gleichgewichtsbindungsstudien der GpL<sub>(CT-LC)</sub>-18D1-Isotyp-Varianten an CD64 mit transient transfizierten HEK293 Zellen. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wurden mock-transfizierte Zellen genutzt. Die  $K_D$ -Werte wurden mithilfe der Funktion „nicht-lineare Regression“ des Programms GraphPad Prism 5.0 berechnet. **(B)** Homologe Konkurrenzexperimente zur Bestimmung des  $K_i$ -Wertes des parentalen, nicht-markierten Antikörpers 18D1-mIgG2A an CD64. HEK293-CD64-Transektanten wurden mit den angegebenen Konzentrationen des parentalen Antikörpers 18D1-mIgG2A inkubiert bei gleichzeitiger Zugabe von konstant 30 pM des GpL-18D1-mIgG2A-Fusionsproteins. Der  $K_i$ -Wert wurde über die in A ermittelte Affinität und das Programm GraphPad Prism 5.0 angenähert. A und B zeigen je ein repräsentatives Experiment, die Mittelwerte aller durchgeführten Versuche sind in Tabelle 7 zusammengefasst. n.sp. = nicht spezifische Bindung.

Vergleicht man abschließend die in dieser Arbeit ermittelten  $K_D$ -Werte verschiedener dimerer Antikörper-Isotypen mit den in der Literatur zugänglichen Daten, so zeigt sich wie bereits

erwähnt eine Übereinstimmung bezüglich der geringen bzw. nicht vorhandenen Bindung von IgG2-Antikörpern an den für IgG1-Antikörpern hoch affinen FcγR CD64. Eine spezifische Bindung konnte in dieser Arbeit für das Fusionsprotein GpL-18D1-IgG2 an CD64 nicht detektiert werden. Gleiches gilt für die Bindung von GpL-18D1-IgG2 an CD16, wobei hier  $K_D$ -Werte zwischen 14 – 70  $\mu$ M veröffentlicht wurden. Diese Daten basieren allerdings auf zellfreien Methoden zur Analyse der Bindungsstärke zwischen Antikörper und CD16. Die hier bestimmten  $K_D$ -Werte von GpL<sub>(CT-LC)</sub>-IgG2-18D1 an CD32A und CD32B lagen bei 283 nM bzw. 108 nM. Betrachtet man die Literaturangaben, sind diese um ein vielfaches höher (1,2 -10  $\mu$ M bzw. 20 – 50  $\mu$ M). Dies lässt vermuten, dass die Bindungseigenschaften von IgG2-Antikörpern an CD32A und CD32B durch zellfreie Experimente bisher unterschätzt wurden. Literaturangaben für murine Antikörper an humane Fcγ-Rezeptoren sind momentan nicht veröffentlicht. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das GpL-18D1-mIgG1-Fusionsprotein nicht an CD16 und CD64 bindet, jedoch an CD32A und CD32B. D.h. der murine IgG1-Isotyp verhält sich dem humanen IgG2-Isotyp sehr ähnlich, da beide in den Versuchen nicht spezifisch an CD16 und CD64 gebunden haben, jedoch an CD32A und CD32B. Außerdem waren die Affinitäten für CD32A in sehr guter Übereinstimmung. Das GpL-18D1-mIgG2A-Fusionsprotein hingegen hat spezifisch an alle vier untersuchten Fcγ-Rezeptoren gebunden und zeigte dabei mit einem  $K_D$ -Wert von 67 nM eine unerwartet hohe Affinität für den mittel bis schwach affinen CD32A (Tab. 7).

**Tabelle 7: Übersicht der  $K_D$ -Werte der verschiedenen GpL<sub>(CT-LC)</sub>-18D1-Isotypen an humane Fcγ-Rezeptoren**

Interaktion	Anzahl der Versuche	Einzelne $K_D$ -Werte (nM)	Mittlerer $K_D$ (nM)	$K_D$ für FcγR-IgG1 Interaktion laut Literatur (nM)
GpL(CT-LC)-18D1-IgG2 – CD16	6	n. sp.	-	14000 – 70000 <sup>(b, c)</sup>
GpL(CT-LC)-18D1-mIgG1 – CD16	6	n. sp.	-	-
GpL(CT-LC)-18D1-mIgG2A – CD16	4	170, 661, 117, 609	389 ± 285	-
GpL(CT-LC)-18D1-IgG2 – CD32A	6	86, 463, 189, 178, 410, 373	283 ± 152	1200 – 10000 <sup>(b)</sup>
GpL(CT-LC)-18D1-mIgG1 – CD32A	6	101, 228, 541, 336, 80, 213	250 ± 171	-
GpL(CT-LC)-18D1-mIgG2A – CD32A	6	47, 100, 48, 101, 89, 19	67 ± 34	-
GpL(CT-LC)-18D1-IgG2 – CD32B	3	74, 95, 154	108 ± 41	20000 – 50000 <sup>(c, d)</sup>
GpL(CT-LC)-18D1-mIgG1 – CD32B	4	275, 484, 626, 566	488 ± 153	-
GpL(CT-LC)-18D1-mIgG2A – CD32B	4	218, 160, 175, 362	229 ± 92	-
GpL(CT-LC)-18D1-IgG2 – CD64	3	n. sp.	-	- / 205000 <sup>(b, c)</sup>
GpL(CT-LC)-18D1-mIgG1 – CD64	3	n. sp.	-	-
18D1-mIgG2A – CD64	3	9, 4, 3	6 ± 3 <sup>a</sup>	-
GpL(CT-LC)-18D1-mIgG2A – CD64	4	16, 15, 21, 14	17 ± 3 <sup>a</sup>	-

<sup>a</sup> Affinität für CD64 wurde mittels t-Test analysiert.

Signifikanter Unterschied in der CD64-Bindung ( $p < 0,05$ )

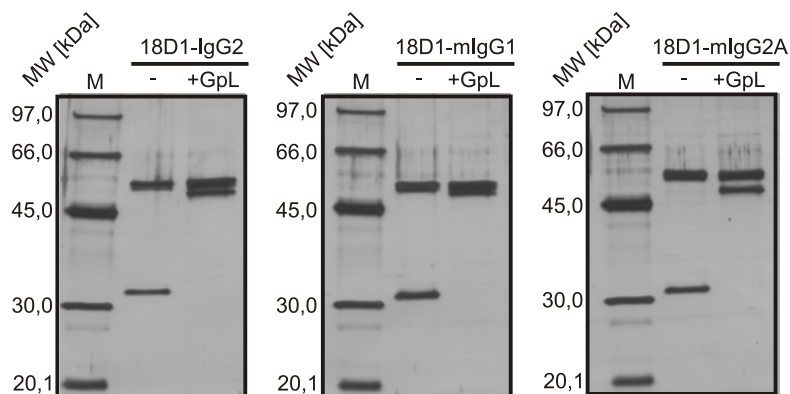
<sup>b</sup> (Vafa et al., 2014)

<sup>c</sup> (Bruhns and Jonsson, 2015)

<sup>d</sup> (Bruhns et al., 2009)

### 4.2.3 Agonistische Aktivität der 18D1-Isotyp-Varianten in Abhängigkeit von FcγR-Bindung

Um die funktionellen Eigenschaften der verschiedenen GpL<sub>(CT-LC)</sub>-18D1-Isotypen beurteilen zu können, wurden diese in den folgenden Versuchen wiederum mit den parentalen, nicht markierten 18D1-Isotyp-Varianten verglichen. Die Konzentration und Reinheit der insgesamt sechs Konstrukte wurde nach anti-FLAG-Affinitätsreinigung und SDS-Page im Silbergel überprüft (Abb. 18), um sicher zu stellen, dass eventuelle Unterschiede in der Funktionalität der parentalen und der markierten Antikörper nicht auf unterschiedliche Konzentrationen zurück zu führen sind.



**Abbildung 18: Silberfärbung der verschiedenen 18D1-Isotyp-Varianten mit und ohne GpL-Markierung**

200 ng der jeweiligen 18D1-Fusionsproteine wurden nach anti-FLAG-Affinitätsreinigung über eine SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mittels Silberfärbung detektiert. kDa= Kilodalton, M= Marker, MW= *molecular weight*.

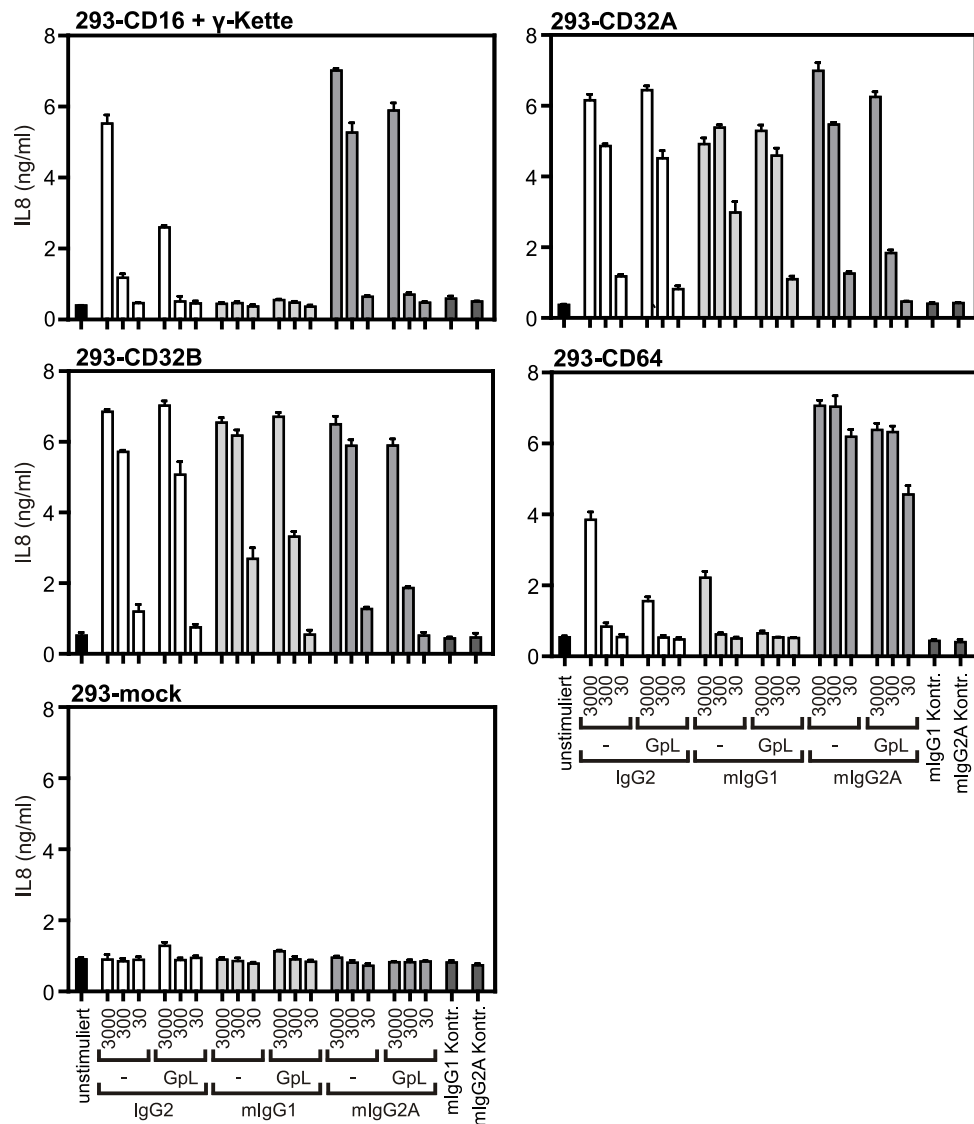
Die Funktionalität der Fn14-spezifischen 18D1-Isotypen wurde über Kokultur-Versuche analysiert. Hierfür wurden HEK293 Zellen transient mit FcγR-Expressionsplasmiden transfiziert und anschließend zusammen mit den jeweiligen 18D1-Isotyp-Varianten zu WiDr Zellen gegeben. Der Überstand wurde am nächsten Tag mittels ELISA hinsichtlich seines Gehalts an IL8 untersucht, welches infolge der Fn14-Aktivierung induziert wird. Dabei zeigte sich, dass die untersuchten dimeren 18D1-Isotypen IgG2, mIgG1 und mIgG2A ohne Bindung an Fcγ-Rezeptoren kein agonistisches Potential haben, da WiDr Zellen in Kombination mit mock-transfizierten HEK293 und den verschiedenen Antikörpern kein IL8 in den Überstand sekretierten. 18D1-mIgG2A konnte in Verbindung mit allen untersuchten FcγR IL8 induzieren,

was mit den Bindungsdaten übereinstimmt, da das GpL-18D1-mIgG2A-Fusionsprotein spezifisch an alle untersuchten FcγR bindet. Die stärkste agonistische Aktivität zeigte der 18D1-mIgG2A-Antikörper nach Bindung an den hoch affinen FcγR CD64, wobei kein Unterschied zwischen dem parentalen 18D1-mIgG2A und der GpL<sub>(CT-LC)</sub>-markierten Variante erkennbar war. Im Hinblick auf die nieder bis mäßig affinen Rezeptoren CD16, CD32A und CD32B war die maximale IL8-Induktion der markierten und nicht-markierten 18D1-mIgG2A-Varianten zwar identisch, jedoch zeigte das GpL<sub>(CT-LC)</sub>-18D1-mIgG2A-Fusionsprotein konzentrationsabhängig eine verminderte agonistische Wirkung, was durch einen reduzierten IL8-Gehalt im untersuchten Überstand deutlich wurde. Der humane 18D1-IgG2-Antikörper besaß nach Bindung an CD32A und CD32B in parentaler und in GpL-markierter Form gleiches agonistisches Potential bezüglich der maximalen und der konzentrationsabhängigen IL8-Induktion. Die GpL<sub>(CT-LC)</sub>-18D1-IgG2-abhängige IL8-Induktion in Verbindung mit CD16 und CD64 war im Hinblick auf die maximale Induktion leicht minimiert im Hinblick zum parentalen Antikörper. Vergleicht man die IL8-Konzentration im Überstand der WiDr Zellen nach 18D1-IgG2-Stimulation mit CD32A/B-Kokultur und CD16- bzw. CD64-Kokultur, so lässt sich deutlich erkennen, dass CD32A/B den Antikörper in einen stärkeren Agonisten überführt haben als CD16 bzw. CD64 (Abb. 19). Dies deckt sich mit den Bindungsdaten aus Tabelle 7, aus der hervorgeht, dass es bei den durchgeführten Gleichgewichtsbindungsstudien zu keiner spezifischen Bindung von 18D1-IgG2 an CD16 und CD64 kam bzw. die Affinität laut Literatur sehr gering ist. Für das GpL<sub>(CT-LC)</sub>-18D1-mIgG1-Fusionsprotein konnte ebenso keine Bindung an CD16 und CD64 nachgewiesen werden (Tab. 7). Passend dazu konnte in den Kokultur-Versuchen mit CD16 transfizierten HEK293 Zellen keine IL8-Induktion nachgewiesen werden, weder für den parentalen noch für den GpL-markierten 18D1-mIgG1-Antikörper. Eine schwache IL8-Induktion konnte im Rahmen der CD64-Kokultur bei hohen Konzentrationen des parentalen 18D1-mIgG1-Antikörpers detektiert werden. Das agonistische Potential der beiden 18D1-mIgG1-Antikörper war nach Bindung an CD32A und CD32B hinsichtlich ihrer maximalen IL8-Induktion identisch, nur die konzentrationsabhängige Aktivität war in den Versuchen mit dem parentalen Antikörper etwas stärker (Abb. 19).

Abschließend betrachtet konnte in den durchgeführten Versuchen demonstriert werden, dass die genetische Fusionierung der *Gaussia princeps* Luziferase an den C-Terminus der leichten Kette nicht nur für die IgG1-Form des Fn14-spezifischen Antikörpers 18D1, sondern auch für die dimeren Isotypen IgG2, mIgG1 und mIgG2A eine geeignete Möglichkeit darstellt, die



generierten Fusionsproteine hinsichtlich ihrer Antigenbindung und der Bindung an Fcγ-Rezeptoren zu untersuchen, ohne dass es dabei zu Abweichungen gegenüber den parentalen Antikörpern kommt. Auch die Funktionalität der jeweiligen GpL<sub>(CT-LC)</sub>-18D1-Isotypen zeigte keine gravierenden Veränderungen im Vergleich zu den nicht-markierten Isotypen, jedoch ist die hier detektierte maximale und/oder konzentrationsabhängige IL8-Induktion infolge der Aktivierung des NFκB-Systems zum Teil leicht minimiert.



**Abbildung 19: FcγR-Bindung ist für die agonistische Aktivität der untersuchten 18D1-IgG-Isotyp-Varianten notwendig**

HEK293 Zellen wurden transient mit FcγR-kodierenden Expressionsplasmiden bzw. einem Leervektor (mock) transfiziert. Nach zwei Tagen wurden die Zellen geerntet und mit den angegebenen Konzentrationen an 18D1-IgG-Fusionsproteinen für 30 min vorinkubiert. Anschließend wurde dieser Mix zu bereits am Vortag ausgesäten WiDr Zellen gegeben. Am nächsten Tag wurde die IL8-Konzentration im Überstand mittels ELISA bestimmt.

### 4.3. GpL-Markierung zur Charakterisierung von Antikörpern ist auch für andere TNFRSF-Rezeptor-spezifische Antikörper geeignet

CD40, CD95 und der LT $\beta$ R gehören zur Familie der Rezeptoren der TNFRSF. CD40 zählt zu den TRAF-interagierenden Rezeptoren der TNFRSF und spielt eine wichtige Rolle im Rahmen der adaptiven Immunreaktion. CD40 wird von B-Zellen, dendritischen Zellen, Monozyten und Makrophagen exprimiert wie auch von nicht-blutbildenden Zellen wie Fibroblasten und Epithelzellen (Elgueta et al., 2009). Wie CD40 ist auch der LT $\beta$ R ein TRAF-interagierender Rezeptor der TNFRSF. Der LT $\beta$ -Rezeptor gehört zu den Schlüsselfaktoren innerhalb der Entwicklung, Organisation und der Homöostase lymphoider Organen und Geweben sowie in vielen weiteren biologischen Prozessen. Eine stabile Expression ist auf Endothel- und Epithelzellen zu finden, aber auch auf vielen myeloiden Zelltypen (Fernandes et al., 2016). CD95, auch Fas oder APO-1 genannt, zählt wie TNF zu den Todesrezeptoren der TNFRSF und wird ubiquitär im Körper exprimiert. Die stärkste Expression lässt sich dabei auf Zellen des Thymus, der Leber, des Herzens und der Niere finden. Die CD95-induzierte Apoptose stellt einen zentralen Punkt der Homöostase der Immunzellen dar und ist bei der Eliminierung von Virus-erkrankten Zellen oder Krebszellen wichtig (Peter et al., 2015). Wegen ihrer Funktion stellen die beschriebenen Rezeptoren CD40, LT $\beta$ R und CD95 ein potentielles Ziel für Antikörper-basierte Therapien dar, da eine Fehlregulation dieser Moleküle zu vielen verschiedenen Krankheitsbildern führt.

Im abschließenden Teil der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob das Konzept der genetischen Fusion der *Gaussia princeps* Luziferase an Antikörper zur besseren Charakterisierung auch auf andere Antikörper als den Fn14-spezifischen 18D1-Antikörper übertragbar ist. Dazu wurden der CD95-spezifische Antikörper E09-IgG1 (Chodorge et al., 2012), der LT $\beta$ R-spezifische Antikörper BHA10-IgG1 (Michaelson et al., 2009) sowie der CD40-spezifische Antikörper G28.5-IgG1 (Clark et al., 1988) verwendet. Die GpL-Markierung ist bei allen Antikörpern am C-Terminus der leichten Kette zu finden (GpL<sub>(CT-LC)</sub>).

### 4.3.1 Affinitätsbestimmung der untersuchten CD95-, LT $\beta$ R- und CD40-spezifischen Antikörper für ihre jeweiligen Antigene

Zur Bestimmung der Affinität der GpL<sub>(CT-LC)</sub>-markierten Antikörper-Varianten von E09-IgG1, BHA10-IgG1 und G28.5-IgG1 für ihre Antigene wurden Gleichgewichtsbindungsstudien auf transient transfizierten HEK293 Zellen (CD95 und LT $\beta$ R) bzw. HT1080 Zellen, die stabil mit CD40 transfiziert wurden, durchgeführt. Anschließend wurden die  $K_D$ -Werte über das Programm GraphPad Prism 5.0 ermittelt. Für das CD95-spezifische GpL<sub>(CT-LC)</sub>-E09-IgG1-Fusionsprotein ergab sich im Mittel ein  $K_D$ -Wert von 4 nM, für das LT $\beta$ R spezifische GpL<sub>(CT-LC)</sub>-BHA10-IgG1-Fusionsprotein ein  $K_D$ -Wert von 2 nM und für das CD40-spezifische GpL<sub>(CT-LC)</sub>-G28.5-IgG1-Fusionsprotein ein  $K_D$ -Wert von 4 nM (Tab. 8). Je eine repräsentative Gleichgewichtsbindungsstudie ist in Abbildung 20-A dargestellt. Um die Affinität der untersuchten GpL-Fusionsproteine mit ihrem jeweiligen parentalen, nicht-markierten Antikörpern vergleichen zu können, wurden auf den gleichen Zelltypen homologe Konkurrenzexperimente durchgeführt. Hierfür wurden die parentalen Antikörper wie in Abbildung 20-B angegeben titriert, während der zugehörige GpL-markierte Antikörper konstant zugegeben wurde. Anschließend wurden die  $K_i$ -Werte über GraphPad Prism 5.0 sowie die zuvor ermittelten  $K_D$ -Werte der GpL-Antikörper-Varianten ermittelt. Die mittleren berechneten  $K_i$ -Werte lagen für E09-IgG1 bei 29 nM, für BHA10-IgG1 bei 10 nM und für G28.5-IgG1 bei 21 nM. Die so bestimmten Affinitäten zeigten kleine aber signifikante Unterschiede im Vergleich zu denen der GpL-markierten Antikörper (Tab. 8).

**Tabelle 8:  $K_D$ -Werte der anti-CD95, -LT $\beta$ R- und -CD40-IgG1-Fusionsproteine für ihr jeweiliges Antigen**

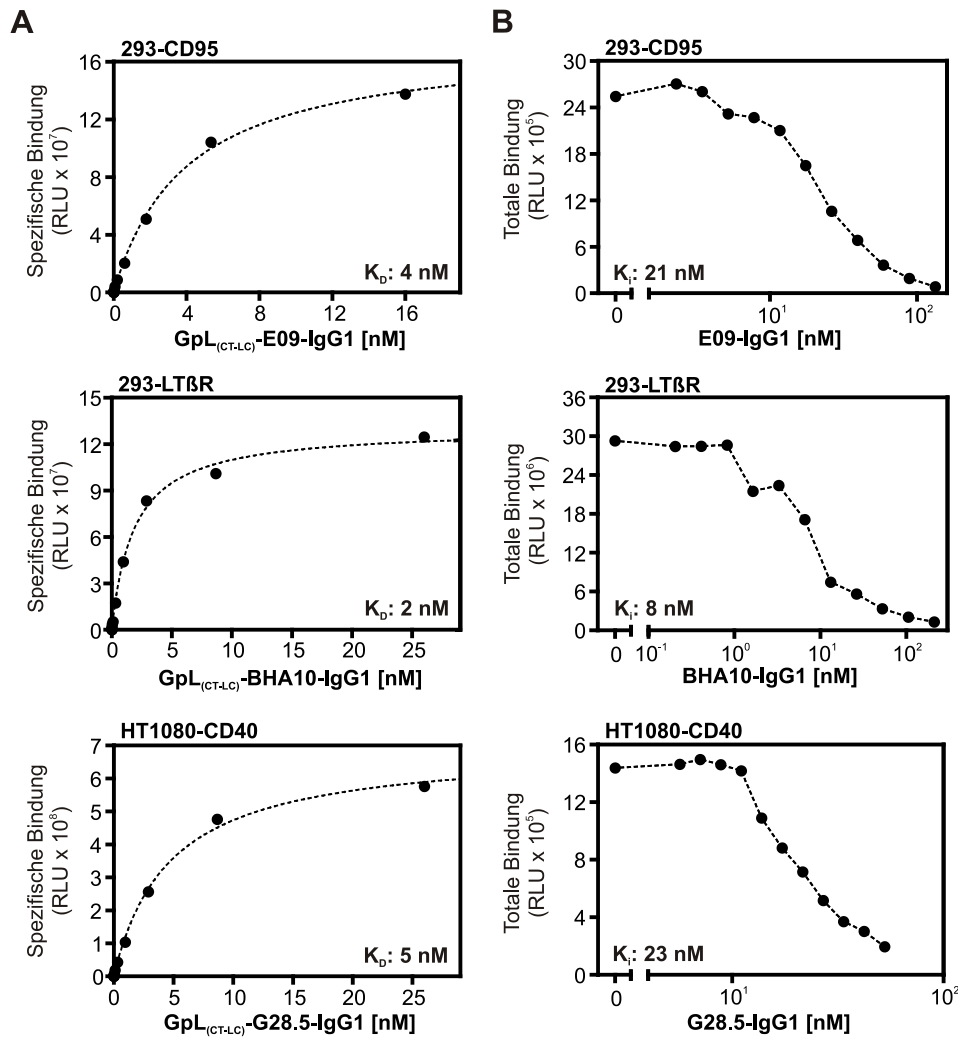
Interaktion	Anzahl der Versuche	Einzelne $K_D$ -Werte (nM)	Mittlerer $K_D$ (nM)
GpL(CT-LC)-E09-IgG1 – CD95	5	4, 4, 4, 5, 4, 2	4 $\pm$ 1 <sup>a</sup>
E09-IgG1 – CD95	5	16, 42, 32, 35, 21	29 $\pm$ 11
GpL(CT-LC)-G28.5-IgG1 –	5	2, 6, 6, 5, 3	4 $\pm$ 2 <sup>b</sup>
G28.5-IgG1 – CD40	8	26, 15, 22, 20, 18, 23, 17, 24	21 $\pm$ 4
GpL(CT-LC)-BHA10-IgG1 –	7	2, 2, 1, 3, 3, 2, 2	2 $\pm$ 1 <sup>c</sup>
BHA10-IgG1 – LT $\beta$ R	5	5, 4, 11, 8, 20	10 $\pm$ 6

$K_D$ -Werte der Antikörper mit demselben Antigen wurden mittels t-Test analysiert.

<sup>a</sup> Signifikant unterschiedlich im Vergleich mit dem  $K_D$  von E09-IgG1 ( $p < 0.001$ )

<sup>b</sup> Signifikant unterschiedlich im Vergleich mit dem  $K_D$  von G28.5-IgG1 ( $p < 0.001$ )

<sup>c</sup> Signifikant unterschiedlich im Vergleich mit dem  $K_D$  von BHA10-IgG1 ( $p < 0.05$ )



**Abbildung 20: Affinitätsbestimmung der E09-, BHA10- und G28.5-IgG1-Fusionsproteine**

**(A)** Gleichgewichtsbindungsstudien von GpL<sub>(CT-LC)</sub>-E09-IgG1, GpL<sub>(CT-LC)</sub>-BHA10-IgG1 und GpL<sub>(CT-LC)</sub>-G28.5-IgG1 an ihre Antigene CD95, LTβR und CD40. Hierfür wurden transient transfizierte HEK293 Zellen (CD95 und LTβR) bzw. stabil transfizierte HT1080-CD40 Zellen genutzt. Die  $K_D$ -Werte wurden mithilfe der Funktion „nicht-lineare Regression“ des Programms GraphPad Prism 5.0 berechnet. **(B)** Homologe Konkurrenzexperimente zur Bestimmung der  $K_i$ -Werte der parentalen, nicht-markierten Antikörper E09-, BHA10 und G28.5-IgG1 an HEK293-Transfektanten bzw. HT1080-CD40 Zellen. Die Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen der parentalen Antikörper inkubiert bei gleichzeitiger Zugabe von konstant 20 pM, 667 pM bzw. 10 pM der GpL-markierten Variante. Der  $K_i$ -Wert der jeweiligen Antikörper wurde über das Programm GraphPad Prism 5.0 und den  $K_D$ -Werten, die für die zugehörigen GpL-Antikörper-Fusionsproteine in A erhalten wurden, angenähert. Gezeigt ist je ein repräsentatives Experiment. Die Durchschnittswerte aller durchgeführten Versuche von A und B sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

### **4.3.2 Die Aktivität der CD95-, LT $\beta$ R- und CD40- spezifischen Antikörper wird durch die GpL-Markierung nicht beeinflusst**

Um die Funktionalität der CD95-, LT $\beta$ R- bzw. CD40-spezifischen Antikörper E09-IgG1, BHA10-IgG1 und G28.5-IgG1 mit und ohne GpL<sub>(CT-LC)</sub>-Markierung vergleichen zu können, wurden wiederum Kokultur-Versuche durchgeführt. Dabei wurden Fc $\gamma$ R-exprimierende HEK293-Transfektanten mit den verschiedenen Fusionsproteinen vorinkubiert und anschließend auf bereits am Vortag ausgesäte Effektor-Zellen gegeben. Für BHA10-IgG1 handelte es sich dabei um HT29 Zellen, für die beiden anderen Antikörper wurden die bereits erwähnten HT1080-CD40 Zellen genutzt, die endogen CD95 exprimieren und stabil mit einem CD40-kodierendem Expressionsplasmid transfiziert wurden. Der IL8-Gehalt im Überstand wurde am nächsten Tag über einen ELISA bestimmt. Für die untersuchten Varianten von E09-IgG1 wurde der Versuch zusätzlich unter Anwesenheit von zVAD-fmk und CHX durchgeführt. Die HT1080-CD40 Zellen wurden für 30 min mit den beiden Reagenzien vorinkubiert. zVad-fmk ist ein Caspase-Inhibitor und verhinderte die CD95-induzierte Apoptose der HT1080-CD40 Zellen. CHX reduziert weiterhin die Expression kurzlebiger Proteine, die die CD95-induzierte Signaltransduktion hemmen.

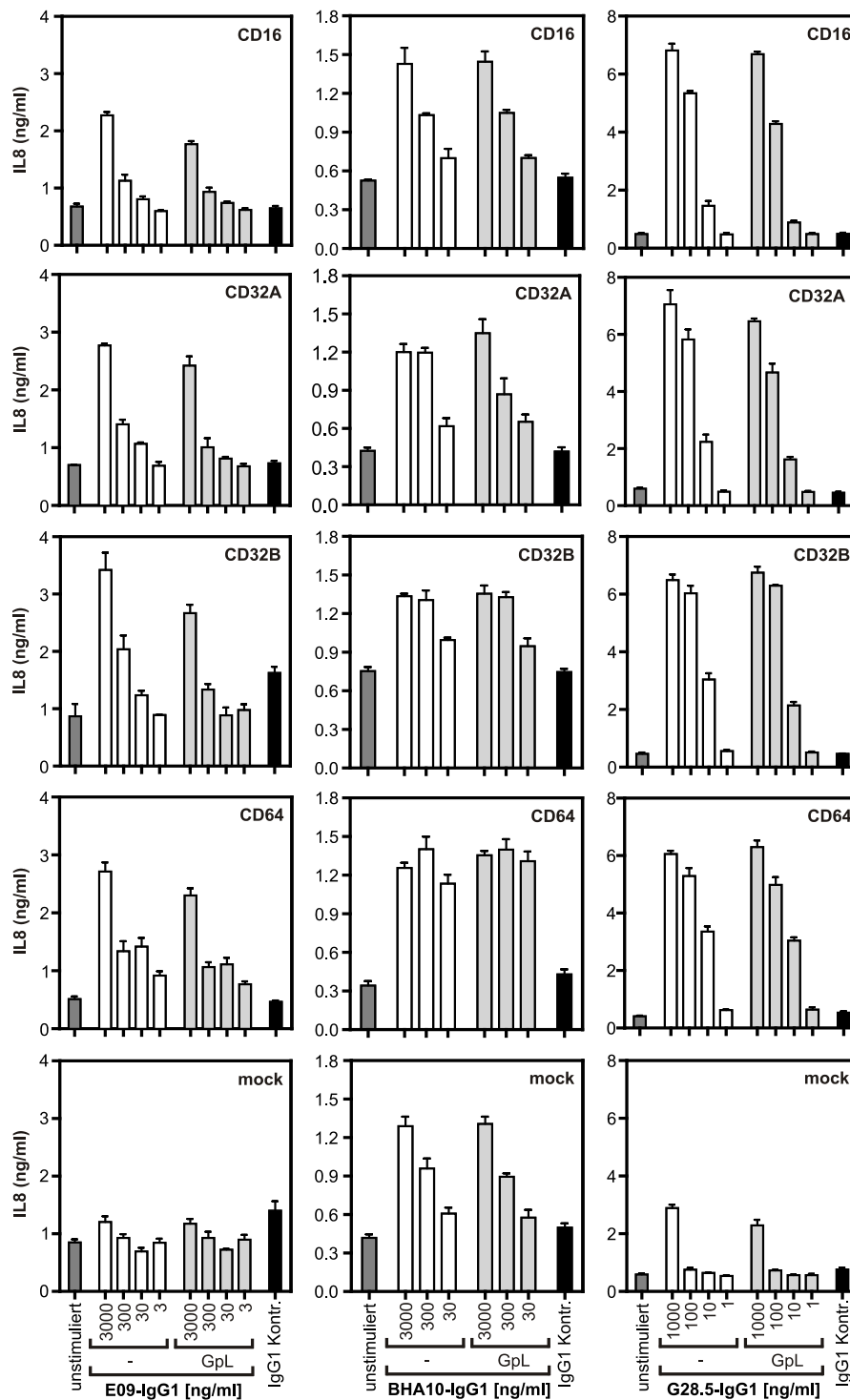
Der Versuch zeigte, dass beide E09-IgG1-Varianten ohne Bindung an einen Fc $\gamma$ R keine agonistische Wirkung besitzen. Die Kokultur-Versuche mit den verschiedenen Fc $\gamma$ R-Transfektanten überführten sowohl den parentalen als auch den GpL-markierten anti-CD95-Antikörper E09-IgG1 in Agonisten. Im Hinblick auf den IL8-Gehalt im Überstand der Zellen war kein Unterschied zwischen parentalen und GpL-markierten Fusionsprotein erkennbar, sowohl bezüglich der maximalen IL8-Produktion als auch der Konzentrationsabhängigkeit der IL8-Induktion (Abb. 21, linke Spalte).

Für G28.5-IgG1 zeigte sich, dass der Antikörper in Verbindung mit mock-transfizierten HEK293 Zellen zumindest bei der höchsten eingesetzten Konzentration (1000 ng/ml) eine IL8-Sekretion der HT1080-CD40 Zellen induzieren konnte. Daraus lässt sich schließen, dass der Antikörper bereits ohne Fc $\gamma$ R-Bindung ein gewisses agonistisches Potential besitzt, wobei keine Unterschiede zwischen der parentalen und der GpL-markierten Form erkennbar waren. In Verbindung mit den untersuchten Fc $\gamma$ -Rezeptoren CD16, CD32A, CD32B und CD64 wurde die Antikörper-induzierte IL8-Produktion jedoch noch deutlich erhöht, zum einen auf die

maximale IL8-Induktion (von 3 ng/ml auf 7 ng/ml) bezogen sowie auch auf die konzentrationsabhängige IL8-Induktion. Hier konnte zum Teil selbst bei 10 ng/ml eingesetztem Antikörper noch eine IL8-Sekretion von 3 ng/ml detektiert werden (CD64). Betrachtet man den parentalen G28.5-IgG1-Antikörper vergleichend mit dem GpL-markierten Fusionsprotein, so lassen sich für die verschiedenen FcγR keinerlei Unterschiede in der Dosisabhängigen wie auch der maximalen IL8-Induktion erkennen (Abb. 21, rechte Spalte).

Im Gegensatz zu den bereits betrachteten Antikörpern E09-IgG1 und G28.5-IgG1 erwies sich in den Kokultur-Versuchen der LTβR-spezifische BHA10-IgG1 Antikörper bereits ohne FcγR-Bindung als potenter Agonist, dessen Aktivität durch die Bindung an die mäßig- bis schwach-affinen FcγR CD16, CD32A und CD32B nur geringfügig erhöht wurde. Einzig der Kokultur-Versuch mit dem für IgG1 hoch affinen CD64 führte zu einer deutlichen Steigerung der agonistischen Wirkung. Vergleicht man die IL8-Induktion des GpL-markierten BHA10-IgG1-Fusionsproteins mit dem parentalen, nicht-markierten BHA-IgG1 so ließen sich keinerlei Unterschiede hinsichtlich des agonistischen Potentials erkennen (Abb. 21, mittlere Spalte).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Versuche der vorliegenden Arbeit gezeigt haben, dass die genetische Fusion der *Gaussia princeps* Luziferase an Antikörper eine sehr gute Möglichkeit darstellt, die Bindungseigenschaften von Antikörpern auf zellulärer Ebene zu charakterisieren. Dabei werden durch die GpL-Markierung weder die Bindungseigenschaften noch die Funktionalität der Antikörper gravierend beeinflusst.



**Abbildung 21: Aktivität der E09-, BHA- und G28.5-IgG1-Fusionsproteine wird durch die GpL-Markierung nicht beeinflusst**

HEK293 Zellen wurden transient mit FcγR-kodierenden Expressionsplasmiden bzw. einem Leervektor (mock) transfiziert. CD16 und CD64 wurden mit FcεR1γ (γ-Kette) kotransfiziert. Nach zwei Tagen wurden die Zellen geerntet und mit den angegebenen Konzentrationen der E09-, BHA10- und G28.5-IgG1-Fusionsproteine für 30 min vorinkubiert. Anschließend wurde dieser Mix zu bereits am Vortag ausgesäten Effektor-Zellen gegeben. Dabei handelt es sich für BHA10-IgG1 um HT29 Zellen, für E09- und G28.5-IgG1 um HT1080-CD40 Zellen. Die Kokultur für E09-IgG1 wurde zudem in Anwesenheit von 20 μM zVAD-fmk und 1 μg/ml CHX durchgeführt. Am nächsten Tag wurde die IL8-Konzentration im Überstand mittels ELISA bestimmt.

## 5. Diskussion

Antikörper und Antikörperkonjugate, vor allem solche, die Zelloberflächenantigene erkennen, stellen einen wichtigen Bestandteil in der Therapie und der Diagnostik verschiedenster Erkrankungen dar. Eine genaue Charakterisierung solcher Antikörper und Antikörperkonjugate ist von immenser Bedeutung, um einen bestmöglichen Therapieerfolg zu erzielen, aber auch um eventuelle Nebenwirkungen so gut wie nur möglich zu verhindern. Initial heißt dies, dass die Bindungseigenschaften des Antikörpers an sein Antigen und Fc-Rezeptoren charakterisiert werden müssen. Die zurzeit angewandten Verfahren zur Untersuchung dieser Interaktionen weisen viele Limitationen auf. Zellfreie Verfahren wie die SPR oder ITC können keine zellulären Faktoren berücksichtigen, welche die Bindung von Antigen und Antikörper beeinflussen könnten, die meisten zellulären Methoden hingegen beruhen auf biochemisch markierten Antikörpern, deren Eigenschaften durch die jeweiligen Markierungen beeinflusst werden können. Um diese Limitationen zu umgehen und die Charakterisierung von Antigen-Antikörper-Bindungen entscheidend zu verbessern, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein neuartiges Antikörper-Fusionsproteinformat generiert, bei dem der Antikörper genetisch mit der *Gaussia princeps* Luziferase konjugiert ist.

### 5.1 Vorteile und Nachteile der genetischen Fusion der *Gaussia princeps* Luziferase an Antikörper

Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, dass die genetische Fusion der *Gaussia princeps* Luziferase an das C-terminale Ende der leichten Kette verschiedener Antikörper keinen oder nur einen sehr geringen Einfluss auf dessen Bindungseigenschaften an die jeweiligen Zelloberflächenantigene und die verschiedenen Fc $\gamma$ -Rezeptoren hat. Auch auf funktioneller Ebene sind die neuen GpL-Antikörper-Fusionsproteine vergleichbar mit den parentalen, nicht-markierten Antikörpern und dies sowohl bei Antikörpern, die Oligomerisierung oder eine Fc $\gamma$ -Rezeptor-Bindung für ihre agonistische Aktivität benötigen, als auch bei solchen, die ohne eine Oligomerisierung per se eine maximale agonistische Aktivität besitzen. Dieses Vorgehen hat einige Vorteile gegenüber bisher angewandten Techniken, die zur Charakterisierung von Antigen-Antikörper-Bindungen eingesetzt wurden.

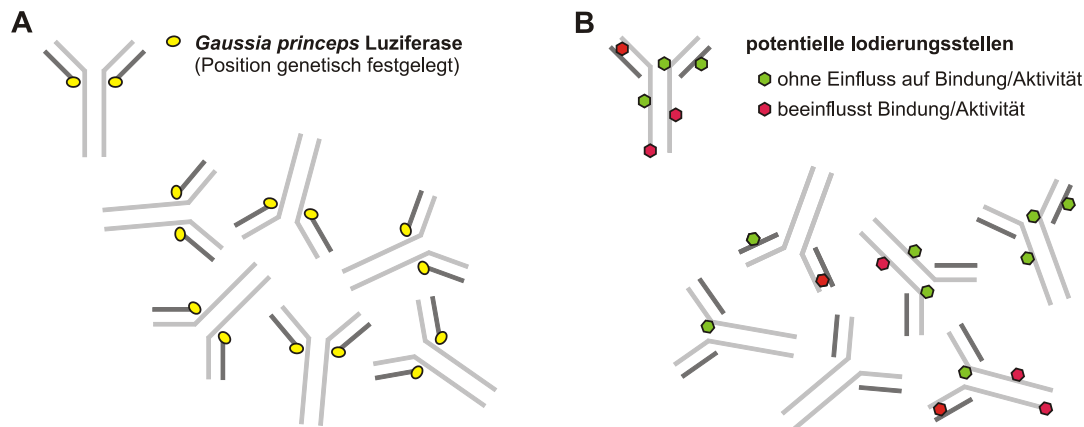
Dazu zählt, dass der apparative Aufwand zur Messung der Luziferaseaktivität sehr viel geringer ist im Vergleich zur Titrationskalorimetrie oder SPR. Die Geräte, die bei diesen beiden



Verfahren benötigt werden, sind in der Anschaffung und Unterhaltung wesentlich teurer als ein Luminometer. Zudem ermöglicht die genetische Fusion der *Gaussia princeps* Luziferase an Antikörper eine Analyse der Bindungseigenschaften an Zelloberflächenantigene auf zellulärer Ebene. Dadurch können zwei wesentliche Limitationen umgangen werden, die sich bei der Anwendung der beiden zuvor genannten Techniken ergeben. Zum einen werden weder der Antikörper noch das Antigen in gereinigter Form benötigt. Für die ITC oder die SPR muss zumindest einer der beiden Bindungspartner gereinigt vorliegen. Dies wäre technisch wesentlich aufwendiger und zudem ist es nicht immer möglich, die jeweiligen Antigene in ausreichender und funktioneller Menge rekombinant zu produzieren. Handelt es sich um bispezifische Antikörper, wird dieses Problem noch schwerwiegender, da gleich zwei Antigene in rekombinanter Form zur Verfügung stehen müssten, um die Bindungseigenschaften des Antikörpers zu charakterisieren. Zum anderen können nun auch zelluläre Faktoren berücksichtigt werden, welche die Dynamik und die Effizienz der Bindung des Antikörper an das Antigen beeinflussen könnten wie beispielsweise verschiedene Komponenten des Zytoskeletts oder Bestandteile der Zellmembran, die mit dem Antigen interagieren.

Zelluläre Untersuchungen zur Charakterisierung der Bindungseigenschaften von Antikörpern wurden bisher meist mithilfe biochemisch markierter Antikörper durchgeführt, die z.B. durch die Konjugation eines Fluorophores an einen Antikörper nach dessen Reinigung oder durch Iodierungen erhalten wurden. Die jeweiligen Verfahren, die für eine solche biochemische Markierung angewandt werden, sind oftmals nur sehr schwer zu reproduzieren. Zudem entstehen meist heterogene Antikörperpopulationen, deren einzelne Moleküle sich sowohl in der Position der jeweiligen Markierung als auch in der Anzahl der markierten Positionen unterscheiden. Daraus ergibt sich, dass die verschiedenen Antikörper auch in ihren Bindungseigenschaften und in ihrer Funktionalität enorm variieren können. Je höher die Anzahl der Markierungen ist, desto höher ist auch das Risiko, dass eine dieser Markierungen mit den Bindungseigenschaften und der Funktionalität des Antikörpers interferiert (Abb. 22). Aus diesem Grund kann die Heterogenität der Antikörper nach einer biochemischen Markierung die Experimente zur Charakterisierung der Affinität eines Antikörpers an sein Antigen immens beeinträchtigen. Im Gegensatz dazu ist durch die genetische Fusion der *Gaussia princeps* Luziferase die Position des Reporters festgelegt. Daraus ergibt sich eine maximale Reproduzierbarkeit, da kein zusätzlicher Markierungsschritt der Antikörper im Anschluss an ihre Reinigung nötig ist und auch die Reinigung selbst nicht notwendig ist. Dies

konnte in der vorliegenden Arbeit anhand dreier völlig unabhängig voneinander gereinigten Chargen des GpL<sub>(CT-LC)</sub>-18D1-IgG1-Fusionsproteins gezeigt werden.



**Abbildung 22: Homogen- und heterogen-markierte Antikörperpopulationen**

Schematische Darstellung einer homogenen Antikörperpopulation, die genetisch mit der *Gaussia princeps* Luziferase fusioniert ist (A) im Vergleich mit einer heterogenen Antikörperpopulation, die aus der biochemischen Markierung mit Iod hervorgeht (B).

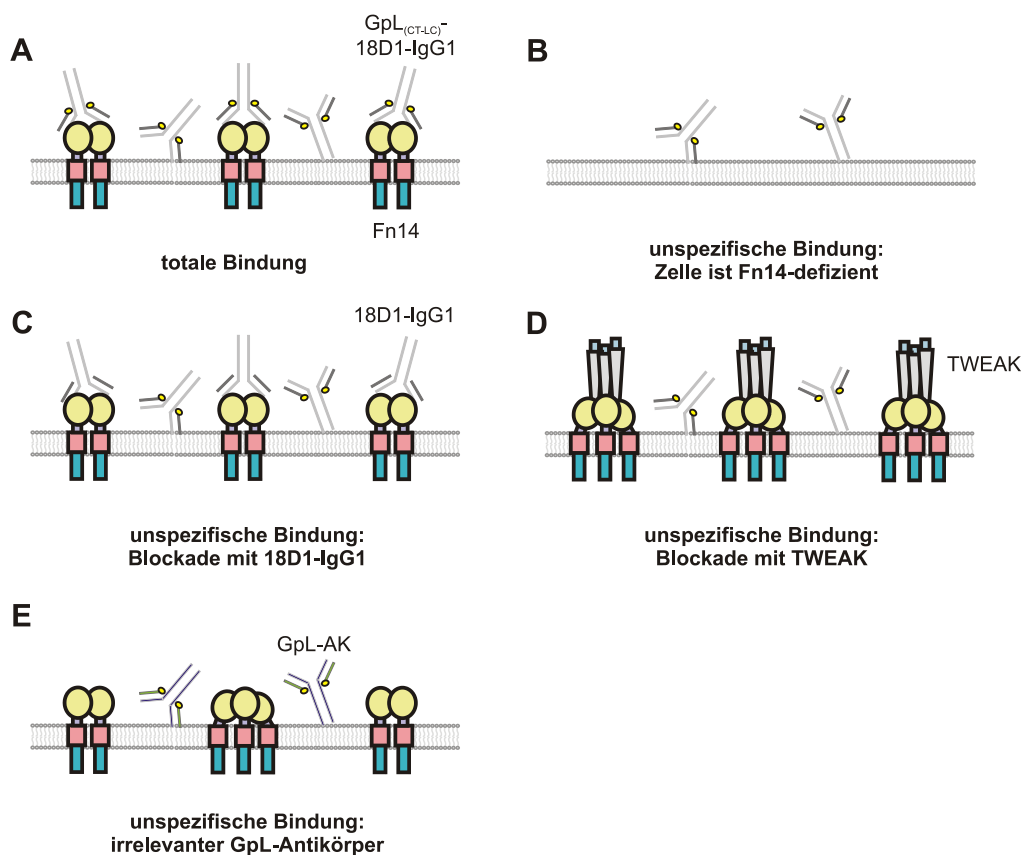
Neben der hier beschriebenen genetischen GpL-Markierung von Antikörpern wurde bereits 2009 von Haas *et al* die genetische Fusion von Antikörpern mit Citrin, einer verbesserten Form von YFP (*yellow fluorescent protein*), beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es mit beiden Markierungsvarianten möglich ist, die Affinität der Antikörper an ihr jeweiliges Antigen zu ermitteln und die Ergebnisse dabei sehr gut übereinstimmen. Allerdings gab es deutliche Unterschiede hinsichtlich der Sensitivität der beiden Reporterdomänen. Während mithilfe der *Gaussia princeps* Luziferase bereits bei 0,002 nM des eingesetzten Fusionsproteins eine spezifische Bindung detektiert werden konnte, war dies bei Verwendung des Citrin-gekoppelten Antikörpers erst bei 0,4 nM möglich. Dies verdeutlicht, dass die Sensitivität der *Gaussia princeps* Luziferase wesentlich höher ist als die des Citrins. Somit ist die *Gaussia princeps* Luziferase sowohl durch die einfache Anwendung und der sehr guten Reproduzierbarkeit als auch im Bereich der Sensitivität den anderen heute angewandten Verfahren zur Charakterisierung der Bindungseigenschaften von Antikörpern zu ihrem jeweiligen Antigen/FcγR deutlich überlegen. Es sei angemerkt, dass die Affinität des parentalen, nicht GpL-markierten Antikörpers für sein Antigen auch über homologe Konkurrenzexperimente mit der GpL-Variante bestimmt werden kann.

Neben den vielen bereits beschriebenen Vorteilen der genetischen Fusionierung von GpL an Antikörper gibt es im Vergleich zur zellfreien SPR oder der ITC auch einen Nachteil: Antikörper-Antigen-Bindungen, die eine sehr schnelle Dissoziation zeigen, können mit den in dieser Arbeit etablierten Protokollen nicht ausreichend analysiert werden, da mehrmaliges manuelles Waschen notwendig ist, um die ungebundenen GpL-Fusionsproteine zu entfernen. Dies dauert bei adhärennten Zellen ungefähr fünf bis zehn Sekunden pro Waschschrift, bei Suspensionszellen erhöht sich die Dauer sogar auf ca. eine Minute. Somit können Antikörper-Antigen-Bindungen, die auch gekühlt (0-4 °C) bereits innerhalb von Sekunden dissoziieren, nicht ausreichend charakterisiert werden. Auch Antikörper, die nur eine sehr geringe Affinität für ihr spezifisches Antigen aufweisen, lassen sich über das hier verwendete Verfahren nur sehr schwer analysieren. Allerdings ist dies nicht nur ein Problem, dass bei der Verwendung der GpL-Markierung auftritt, sondern ein Problem der meisten zellulären Verfahren zur Charakterisierung der Bindung von Antikörpern an ihr Antigen.

Ein genereller Aspekt, der im Hinblick auf die Verwendung der *Gaussia princeps* Luziferase beachtet werden muss, ist, dass für die Quantifizierung letztendlich ein Enzymassay verwendet wird. Enzymatische Reaktionen sind jedoch immer von verschiedenen äußeren Einflüssen abhängig wie der Temperatur oder der Zusammensetzung des Puffers. In früheren Arbeiten der AG Wajant (Lang et al., 2012) konnte z.B. gezeigt werden, wie sensitiv GpL diesbezüglich reagiert. Deswegen ist es sehr wichtig, dass bei jedem Versuch eine interne Kontrolle mitgeführt wird, sprich bei jeder Messung muss neben den eigentlich zu untersuchenden Proben auch die Luziferase-Aktivität einer bekannten Konzentration des zu untersuchenden GpL-Fusionsproteins im entsprechenden Puffer und bei gleicher Temperatur mitgemessen werden, um anschließend die tatsächliche Anzahl der gebundenen Moleküle berechnen zu können.

Ein weiterer allgemeiner Aspekt, der bei jeder Gleichgewichtsbindungsstudie berücksichtigt werden muss, ist die Bestimmung der unspezifischen Bindung. Ohne diese ist eine exakte Bestimmung der Affinität eines Antikörpers an seinen Liganden nicht möglich. In den Versuchen der vorliegenden Arbeit wurde die unspezifische Bindung durch die Inkubation des GpL-Antikörper-Fusionsproteins mit Zellen, die das spezifische Antigen nicht tragen, bestimmt. Darüber hinaus gibt es für Gleichgewichtsbindungsstudien mit GpL-Antikörper-Fusionsproteinen noch drei weitere einfache Methoden, welche die Bestimmung der

unspezifischen Bindung erlauben (Abb. 23). Zum einen kann die unspezifische Bindung erfasst werden, indem man zu dem GpL-Antikörper-Fusionsprotein einen Überschuss (100-1000-fach über  $K_D$ ) der nicht-markierten Antikörpervariante gibt oder eines anderen Antikörpers, der das gleiche Antigen erkennt wie der zu untersuchende Antikörper. Analog dazu kann aber auch der natürliche Ligand verwendet werden, wenn der Ligand den Antikörper zu kompetieren vermag. Zu guter Letzt kann ein GpL-Antikörper-Fusionsprotein zur Bestimmung der unspezifischen Bindung eingesetzt werden, das ein anderes Antigen als der zu untersuchende Antikörper erkennt. Dabei darf dieses Antigen allerdings nicht auf der verwendeten Zelllinie exprimiert werden.



**Abbildung 23: Bestimmung der spezifischen Bindung über die totale und die unspezifische Bindung**

Die spezifische Bindung eines Antikörpers (hier 18D1) an sein Antigen (Fn14) wird durch die Subtraktion der unspezifischen Bindung (**B-E**) von der totalen Bindung (**A**) berechnet, wobei es wie hier gezeigt verschiedene Möglichkeiten gibt, die unspezifische Bindung zu determinieren. GpL= *Gaussia princeps* Luziferase, AK= Antikörper.

## 5.2 Vergleich der GpL-Markierung mit alternativen, positionsspezifischen Markierungstechniken

Viele Verfahren, die dazu dienen Antikörper biochemisch zu markieren, weisen, wie bereits erwähnt, das schwerwiegende Problem auf, dass eine heterogene Antikörperpopulation erzeugt wird. In den letzten Jahren sind allerdings verschiedene Verfahren entwickelt worden, um Antikörper an einer spezifischen Position zu markieren. Diese Antikörper sind genau wie das hier generierte GpL-Antikörper-Fusionsproteinformat in der Lage, Antigen-Antikörper-Bindungen auf zellulärer Ebene exakt zu charakterisieren, sind aber meist in der Herstellung wesentlich teurer und zeitaufwendiger oder nicht in jeder Hinsicht funktionell neutral.

Eine sehr populäre Methode in diesem Bereich ist die Markierung von Antikörpern mit dem sogenannten SNAP-Tag. Hierbei wird der Antikörper als Fusionsprotein mit dem DNA-Reparaturenzym O<sup>6</sup>-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase (SNAP-Tag) exprimiert. Um den so hergestellten Antikörper allerdings wirklich detektieren zu können, ist eine zusätzliche biochemische Markierung mit synthetischen O<sup>6</sup>-Benzylguanin-Derivaten von Nöten, die wiederum mit einem Fluorophor oder anderen Reporterstoffen konjugiert sind (Cole, 2013). Vergleichend betrachtet ist das hier generierte GpL-Antikörper-Fusionsproteinformat in der Herstellung um einiges einfacher, da nach der Expression des GpL-Fusionsproteins keine zusätzliche Markierung mehr notwendig ist.

Eine weitere Möglichkeit für gezielte Modifikationen von Antikörpern mit Reporterstoffen stellen bestimmte Aminosäuren von humanen IgG-Antikörpern dar, die konserviert glykosyliert vorliegen. Dazu zählt das Asparagin an Position 297 (N297) in der C<sub>H</sub>2-Domäne von IgG1-Antikörpern (Shields et al., 2002). Diese Position ist auf den ersten Blick sehr geeignet für posttranslationale Modifikationen, da sie weit genug von der variablen Domäne des Antikörpers entfernt ist und somit die Antigen-Antikörper-Bindung voraussichtlich nicht beeinflusst. Allerdings ist die Glykosylierung von N297 ein entscheidender Faktor für die Bindung an die verschiedenen Fcγ-Rezeptoren (Adumeau et al., 2016a; Agarwal and Bertozzi, 2015; Subedi and Barb, 2015). Ist diese nicht mehr gewährleistet, so zeigen Antikörper oftmals keine vollständige oder eine veränderte Funktionalität (DiLillo and Ravetch, 2015), was eine genaue Charakterisierung von Antikörpern nicht mehr ohne weiteres erlaubt. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass GpL-Antikörper-Fusionsproteine unveränderte Bindungseigenschaften sowohl gegenüber dem Antigen als auch Fcγ-Rezeptoren zeigen, was ein entscheidender Vorteil gegenüber der Methode der gezielten posttranslationalen Modifikation von N297 zur Charakterisierung von Antikörpern darstellt. Jedoch sollte man beachten, dass es in speziellen

Fällen auch durchaus gewünscht ist, dass Antikörper durch die inhibierte Bindung an Fcγ-Rezeptoren eine verminderte Immunreaktion initiieren. Aber auch der entgegengesetzte Fall ist oftmals ein erklärtes Ziel, nämlich die verstärkte Bindung an Fcγ-Rezeptoren, beispielsweise um vermehrt ADCC zu induzieren (DiLillo and Ravetch, 2015; Trebing et al., 2014).

Seit einigen Jahren gibt es auch die Möglichkeit Proteine und somit auch Antikörper durch eine Erweiterung des genetischen Codes (*genetic code expansion; GCE*) zu modifizieren und dabei unnatürliche Aminosäuren (*non-canonical amino acid; ncAA*) einzubauen, die den natürlichen Aminosäuren aber sehr ähnlich sind. Normalerweise sind Proteine aus 20 natürlich auftretenden Aminosäuren aufgebaut. Jede Aminosäure wird durch ein oder mehrere mRNA-Codons verschlüsselt. An diese mRNA-Codons binden spezifisch tRNAs (*transfer RNAs*), die das dazugehörige Anticodon besitzen und die jeweiligen Aminosäuren tragen. Beladen werden die tRNAs durch die Aminoacyl-tRNA-Synthetasen (RS). Dem genetischen Code entsprechend gibt es jedoch drei mRNA-Codons, die nicht von einer Aminosäure tragenden tRNA erkannt werden. Dabei handelt es sich um die Stopp-Codons TAG, TAA, TGA. Im Falle der GCE-Methode wird ein neues Paar tRNA/RS synthetisiert, die speziell an diese Stopp-Codons binden und mit einer ncAA beladen sind. Präferiert genutzt wird hier das Amber-Stopp-Codon TAG. Wichtig ist dabei, dass die neu synthetisierte tRNA ausschließlich die ncAA inkooperieren kann. Dies ist ein elegantes, jedoch kein einfaches Verfahren und erfordert sehr viele Arbeitsschritte sowohl in der Herstellung des neuen tRNA/RS-Paars als auch im Bereich der nötigen Selektion. Ein weiterer Nachteil ist, dass nach der Herstellung des ncAA-modifizierten Antikörpers ein weiterer Schritt notwendig ist, um die ncAA mit den gewünschten Reporterstoffen zu konjugieren, auch wenn diese zusätzliche Konjugation hier durch sogenannte Klick-Reaktionen mit einer hohen Effizienz möglich ist (Adumeau et al., 2016b; Nikic and Lemke, 2015). Im Falle der GpL-Antikörper-Fusionsproteine ist ein solcher zusätzlicher Arbeitsschritt nicht nötig, wie bereits ausführlich erwähnt wurde.

Zusammenfassend betrachtet stellt die genetische Fusion der *Gaussia princeps* Luziferase eine wesentlich einfachere, kostengünstigere und weniger zeitintensive Möglichkeit dar, Antikörper positionsspezifisch zu markieren.

### 5.3 GpL-markierte Antikörper als Tracer

Tracer-Moleküle sind meist radioaktiv markierte Moleküle, die unter anderem zur Untersuchung verschiedener Stoffwechselwege eingesetzt werden, aber vor allem im Bereich der Nuklearmedizin Einsatz finden. Dabei werden beispielsweise radioaktiv markierte Antikörper verwendet, die spezifisch an Tumorantigene binden und somit eine Krebserkrankung und deren Ausbreitung sichtbar machen können. Die Bildgebung erfolgt über Positronen-Emissions-Tomografie (PET). Ein enormer Vorteil der radioaktiv markierten Tracer ist, dass aufgrund der sehr sensitiven Nachweismethode nur eine sehr geringe Menge der Substanzen benötigt wird, wodurch kaum Nebenwirkungen der radioaktiven Strahlungen zu erwarten sind. Ein Restrisiko bleibt dennoch bestehen und wird durch häufigere Anwendungen erhöht. Um dieses Restrisiko zu minimieren und auch die Herstellung der Tracer-Antikörper zu vereinfachen, ist eine Anwendung der genetischen Fusion der *Gaussia princeps* Luziferase statt der Verwendung von Radioaktivität denkbar. Einziger Nachteil der *in vivo* Verwendung der GpL-Antikörper-Fusionsproteine im Vergleich zu radioaktiv markierten Antikörpern ist die zur Detektion nötige Injektion des Substrats Luziferin. Einfacher wäre diesbezüglich ein Fluorophor-gekoppelter Antikörper beispielsweise wie die besprochenen Citrin-Antikörper-Fusionsproteine, jedoch ist dabei die Sensitivität des Nachweises zu berücksichtigen.

Seit einigen Jahren werden in der Forschung aber auch solche Antikörper radioaktiv markiert, die bereits zuvor zur Behandlung von Krebserkrankungen eingesetzt worden sind. Ein Beispiel hierfür ist der EGF-Rezeptor-spezifische Antikörper Cetuximab. Mithilfe der radioaktiv markierten Antikörper kann über die sogenannte Immuno-PET nicht nur gezeigt werden, dass der Tumor das Cetuximab spezifische Antigen EGFR trägt und somit für eine Cetuximab-basierte Therapie geeignet ist, sondern auch in welchem Ausmaß der Tumor den Antikörper aufnimmt und wie sich der Tumor im Laufe der Behandlung verhält. Letzteres ist besonders wichtig, da sich die Expression bestimmter Antigene innerhalb eines Tumors rasch ändern kann (Jauw et al., 2016; Tannous et al., 2005; van Dijk et al., 2015). Dieser Ansatz bringt zahlreiche Vorteile mit sich, erhöht allerdings die Strahlenbelastung des Patienten um ein Vielfaches, da der radioaktiv-markierte Antikörper dauerhaft eingesetzt wird. Um diese Risiken zu umgehen, wäre auch hier statt der radioaktiven Markierung eine genetische Fusion der verwendeten Antikörper mit der *Gaussia princeps* Luziferase denkbar, da neben der Vermeidung der radioaktiven Strahlung auch der Herstellungsprozess wesentlich einfacher und schneller wäre.





## 6. Literaturverzeichnis

Adumeau, P., Sharma, S.K., Brent, C., and Zeglis, B.M. (2016a). Site-Specifically Labeled Immunoconjugates for Molecular Imaging--Part 1: Cysteine Residues and Glycans. *Molecular imaging and biology : MIB : the official publication of the Academy of Molecular Imaging* 18, 1-17.

Adumeau, P., Sharma, S.K., Brent, C., and Zeglis, B.M. (2016b). Site-Specifically Labeled Immunoconjugates for Molecular Imaging--Part 2: Peptide Tags and Unnatural Amino Acids. *Molecular imaging and biology : MIB : the official publication of the Academy of Molecular Imaging* 18, 153-165.

Agarwal, P., and Bertozzi, C.R. (2015). Site-specific antibody-drug conjugates: the nexus of bioorthogonal chemistry, protein engineering, and drug development. *Bioconjugate chemistry* 26, 176-192.

Aggarwal, B.B., Gupta, S.C., and Kim, J.H. (2012). Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood* 119, 651-665.

Baxter, F.O., Came, P.J., Abell, K., Kedjouar, B., Huth, M., Rajewsky, K., Pasparakis, M., and Watson, C.J. (2006). IKKbeta/2 induces TWEAK and apoptosis in mammary epithelial cells. *Development* 133, 3485-3494.

Bhatt, P., Vhora, I., Patil, S., Amrutiya, J., Bhattacharya, C., Misra, A., and Mashru, R. (2016). Role of antibodies in diagnosis and treatment of ovarian cancer: Basic approach and clinical status. *J Control Release* 226, 148-167.

Bittner, S., Knoll, G., Fullsack, S., Kurz, M., Wajant, H., and Ehrenschwender, M. (2016). Soluble TL1A is sufficient for activation of death receptor 3. *The FEBS journal* 283, 323-336.

Bodmer, J.L., Schneider, P., and Tschopp, J. (2002). The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends in biochemical sciences* 27, 19-26.

Brandsma, A.M., Jacobino, S.R., Meyer, S., ten Broeke, T., and Leusen, J.H. (2015). Fc receptor inside-out signaling and possible impact on antibody therapy. *Immunol Rev* 268, 74-87.

Bruhns, P., Iannascoli, B., England, P., Mancardi, D.A., Fernandez, N., Jorieux, S., and Daeron, M. (2009). Specificity and affinity of human Fcgamma receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood* 113, 3716-3725.

Bruhns, P., and Jonsson, F. (2015). Mouse and human FcR effector functions. *Immunol Rev* 268, 25-51.

Burkly, L.C. (2014). TWEAK/Fn14 axis: the current paradigm of tissue injury-inducible function in the midst of complexities. *Seminars in immunology* 26, 229-236.

- Burkly, L.C., Michaelson, J.S., Hahm, K., Jakubowski, A., and Zheng, T.S. (2007). TWEAKing tissue remodeling by a multifunctional cytokine: role of TWEAK/Fn14 pathway in health and disease. *Cytokine* 40, 1-16.
- Burkly, L.C., Michaelson, J.S., and Zheng, T.S. (2011). TWEAK/Fn14 pathway: an immunological switch for shaping tissue responses. *Immunol Rev* 244, 99-114.
- Chan, F.K., Chun, H.J., Zheng, L., Siegel, R.M., Bui, K.L., and Lenardo, M.J. (2000). A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science (New York, NY)* 288, 2351-2354.
- Chodorge, M., Zuger, S., Stirnimann, C., Briand, C., Jermutus, L., Grutter, M.G., and Minter, R.R. (2012). A series of Fas receptor agonist antibodies that demonstrate an inverse correlation between affinity and potency. *Cell Death Differ* 19, 1187-1195.
- Clark, E.A., Yip, T.C., Ledbetter, J.A., Yukawa, H., Kikutani, H., Kishimoto, T., and Ng, M.H. (1988). CDw40 and BLCa-specific monoclonal antibodies detect two distinct molecules which transmit progression signals to human B lymphocytes. *European journal of immunology* 18, 451-457.
- Cole, N.B. (2013). Site-specific protein labeling with SNAP-tags. *Current protocols in protein science* 73, Unit 30.31.
- Daeron, M., Jaeger, S., Du Pasquier, L., and Vivier, E. (2008). Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs: a quest in the past and future. *Immunol Rev* 224, 11-43.
- David H. Peters, A.F. (1995). Satumomab Pendetide. *Clinical Immunotherapeutics* 3, 395.
- Desplat-Jego, S., Feuillet, L., Creidy, R., Malikova, I., Rance, R., Khrestchatisky, M., Hahm, K., Burkly, L.C., Pelletier, J., and Boucraut, J. (2009). TWEAK is expressed at the cell surface of monocytes during multiple sclerosis. *Journal of leukocyte biology* 85, 132-135.
- Dhein, J., Daniel, P.T., Trauth, B.C., Oehm, A., Moller, P., and 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* 149, 3166-3173.
- Dickens, L.S., Powley, I.R., Hughes, M.A., and MacFarlane, M. (2012). The 'complexities' of life and death: death receptor signalling platforms. *Experimental cell research* 318, 1269-1277.
- DiLillo, D.J., and Ravetch, J.V. (2015). Fc-Receptor Interactions Regulate Both Cytotoxic and Immunomodulatory Therapeutic Antibody Effector Functions. *Cancer Immunol Res* 3, 704-713.

Dueber, E.C., Schoeffler, A.J., Lingel, A., Elliott, J.M., Fedorova, A.V., Giannetti, A.M., Zobel, K., Maurer, B., Varfolomeev, E., Wu, P., *et al.* (2011). Antagonists induce a conformational change in cIAP1 that promotes autoubiquitination. *Science (New York, NY)* 334, 376-380.

Elgert, K. (2009). *Antibody Structure and Function, Vol 2* (John Wiley & Sons).

Elgueta, R., Benson, M.J., de Vries, V.C., Wasiuk, A., Guo, Y., and Noelle, R.J. (2009). Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol Rev* 229, 152-172.

Engelmann, H., Holtmann, H., Brakebusch, C., Avni, Y.S., Sarov, I., Nophar, Y., Hadas, E., Leitner, O., and Wallach, D. (1990). Antibodies to a soluble form of a tumor necrosis factor (TNF) receptor have TNF-like activity. *The Journal of biological chemistry* 265, 14497-14504.

Feltham, R., Bettjeman, B., Budhidarmo, R., Mace, P.D., Shirley, S., Condon, S.M., Chunduru, S.K., McKinlay, M.A., Vaux, D.L., Silke, J., *et al.* (2011). Smac mimetics activate the E3 ligase activity of cIAP1 protein by promoting RING domain dimerization. *The Journal of biological chemistry* 286, 17015-17028.

Fernandes, M.T., Dejardin, E., and dos Santos, N.R. (2016). Context-dependent roles for lymphotoxin-beta receptor signaling in cancer development. *Biochimica et biophysica acta* 1865, 204-219.

Fick, A., Lang, I., Schafer, V., Seher, A., Trebing, J., Weisenberger, D., and Wajant, H. (2012). Studies of binding of tumor necrosis factor (TNF)-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) to fibroblast growth factor inducible 14 (Fn14). *The Journal of biological chemistry* 287, 484-495.

Grell, M., Wajant, H., Zimmermann, G., and Scheurich, P. (1998). The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 570-575.

Haas, A.K., von Schwerin, C., Matscheko, D., and Brinkmann, U. (2010). Fluorescent Citrine-IgG fusion proteins produced in mammalian cells. *MAbs* 2, 648-661.

Hayden, M.S., and Ghosh, S. (2012). NF-kappaB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes & development* 26, 203-234.

Hermanson, G.T. (1996). *Bioconjugate Techniques* (San Diego, CA: Academic Press).

Hussain, K., Hargreaves, C.E., Roghanian, A., Oldham, R.J., Chan, H.T., Mockridge, C.I., Chowdhury, F., Frendeus, B., Harper, K.S., Strefford, J.C., *et al.* (2015). Upregulation of FcγRIIb on monocytes is necessary to promote the superagonist activity of TGN1412. *Blood* 125, 102-110.

Jauw, Y.W., Menke-van der Houven van Oordt, C.W., Hoekstra, O.S., Hendrikse, N.H., Vugts, D.J., Zijlstra, J.M., Huisman, M.C., and van Dongen, G.A. (2016). Immuno-Positron Emission Tomography with Zirconium-89-Labeled Monoclonal Antibodies in Oncology: What Can We Learn from Initial Clinical Trials? *Frontiers in pharmacology* 7, 131.

Jefferis, R., and Kumararatne, D.S. (1990). Selective IgG subclass deficiency: quantification and clinical relevance. *Clinical and experimental immunology* 81, 357-367.

Kaufmann, S.H.E. (2014). *Basiswissen Immunologie* (Berlin Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg).

Kohler, G., and Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-497.

Kumar, M., Makonchuk, D.Y., Li, H., Mittal, A., and Kumar, A. (2009). TNF-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) activates proinflammatory signaling pathways and gene expression through the activation of TGF-beta-activated kinase 1. *J Immunol* 182, 2439-2448.

Lang, I., Fick, A., Schafer, V., Giner, T., Siegmund, D., and Wajant, H. (2012). Signaling active CD95 receptor molecules trigger co-translocation of inactive CD95 molecules into lipid rafts. *The Journal of biological chemistry* 287, 24026-24042.

Lang, I., Fullsack, S., Wyzgol, A., Fick, A., Trebing, J., Arana, J.A., Schafer, V., Weisenberger, D., and Wajant, H. (2016). Binding Studies of TNF Receptor Superfamily (TNFRSF) Receptors on Intact Cells. *The Journal of biological chemistry* 291, 5022-5037.

Li, F., and Ravetch, J.V. (2013). Antitumor activities of agonistic anti-TNFR antibodies require differential FcγRIIB coengagement in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 19501-19506.

Li, H., Kobayashi, M., Blonska, M., You, Y., and Lin, X. (2006). Ubiquitination of RIP is required for tumor necrosis factor alpha-induced NF-kappaB activation. *The Journal of biological chemistry* 281, 13636-13643.

Little, M. (2015). *Antikörper in der Krebsbekämpfung: Grundlagen, Prinzipien und Anwendungsmöglichkeiten*, Vol 13. März 2015 (Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag).

Liu, H., and May, K. (2012). Disulfide bond structures of IgG molecules: structural variations, chemical modifications and possible impacts to stability and biological function. *MAbs* 4, 17-23.

Liu, X.Y., Pop, L.M., and Vitetta, E.S. (2008). Engineering therapeutic monoclonal antibodies. *Immunol Rev* 222, 9-27.

- Locksley, R.M., Killeen, N., and Lenardo, M.J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* *104*, 487-501.
- Lordick, F., and Janjigian, Y.Y. (2016). Clinical impact of tumour biology in the management of gastroesophageal cancer. *Nat Rev Clin Oncol* *13*, 348-360.
- Luo, Y., Lu, Z., Raso, S.W., Entrican, C., and Tangarone, B. (2009). Dimers and multimers of monoclonal IgG1 exhibit higher in vitro binding affinities to Fcγ receptors. *MAbs* *1*, 491-504.
- Maecker, H., Varfolomeev, E., Kischkel, F., Lawrence, D., LeBlanc, H., Lee, W., Hurst, S., Danilenko, D., Li, J., Filvaroff, E., *et al.* (2005). TWEAK attenuates the transition from innate to adaptive immunity. *Cell* *123*, 931-944.
- Michaelson, J.S., Demarest, S.J., Miller, B., Amatucci, A., Snyder, W.B., Wu, X., Huang, F., Phan, S., Gao, S., Doern, A., *et al.* (2009). Anti-tumor activity of stability-engineered IgG-like bispecific antibodies targeting TRAIL-R2 and LTβR. *MAbs* *1*, 128-141.
- Micheau, O., and Tschopp, J. (2003). Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* *114*, 181-190.
- Mulisch, M. (2013). *Verfahren der Immunlokalisation, Vol 1.* (Wiesbaden: Spektrum Akademischer Verlag).
- Muller, N., Schneider, B., Pfizenmaier, K., and Wajant, H. (2010). Superior serum half life of albumin tagged TNF ligands. *Biochemical and biophysical research communications* *396*, 793-799.
- Murphy, K.M., Mahlke, K., Seidler, L., Travers, P., Haüßer-Siller, I., and Walport, M. (2009). *Janeway Immunologie* (Spektrum Akademischer Verlag).
- Nakayama, M., Kayagaki, N., Yamaguchi, N., Okumura, K., and Yagita, H. (2000). Involvement of TWEAK in interferon gamma-stimulated monocyte cytotoxicity. *The Journal of experimental medicine* *192*, 1373-1380.
- Nguyen, H.H., Park, J., Kang, S., and Kim, M. (2015). Surface plasmon resonance: a versatile technique for biosensor applications. *Sensors (Basel)* *15*, 10481-10510.
- Nikic, I., and Lemke, E.A. (2015). Genetic code expansion enabled site-specific dual-color protein labeling: superresolution microscopy and beyond. *Current opinion in chemical biology* *28*, 164-173.
- Nimmerjahn, F. (2006). Activating and inhibitory FcγRs in autoimmune disorders. *Springer Semin Immunopathol* *28*, 305-319.

Nimmerjahn, F., Gordan, S., and Lux, A. (2015). FcγR dependent mechanisms of cytotoxic, agonistic, and neutralizing antibody activities. *Trends Immunol* 36, 325-336.

Oeckinghaus, A., Hayden, M.S., and Ghosh, S. (2011). Crosstalk in NF-κB signaling pathways. *Nat Immunol* 12, 695-708.

Ofengeim, D., and Yuan, J. (2013). Regulation of RIP1 kinase signalling at the crossroads of inflammation and cell death. *Nature reviews Molecular cell biology* 14, 727-736.

Papoff, G., Hausler, P., Eramo, A., Pagano, M.G., Di Leve, G., Signore, A., and Ruberti, G. (1999). Identification and characterization of a ligand-independent oligomerization domain in the extracellular region of the CD95 death receptor. *The Journal of biological chemistry* 274, 38241-38250.

Peter C. Heinrich, Matthias Müller, and Graeve, L. (2014). *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie* (Berlin Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg).

Peter, M.E., Hadji, A., Murmann, A.E., Brockway, S., Putzbach, W., Pattanayak, A., and Ceppi, P. (2015). The role of CD95 and CD95 ligand in cancer. *Cell Death Differ* 22, 549-559.

Pierce, M.M., Raman, C.S., and Nall, B.T. (1999). Isothermal titration calorimetry of protein-protein interactions. *Methods (San Diego, Calif)* 19, 213-221.

Pinkas, L., Robins, P.D., Forstrom, L.A., Mahoney, D.W., and Mullan, B.P. (1999). Clinical experience with radiolabelled monoclonal antibodies in the detection of colorectal and ovarian carcinoma recurrence and review of the literature. *Nucl Med Commun* 20, 689-696.

Plosker, G.L., and Figgitt, D.P. (2003). Rituximab: a review of its use in non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukaemia. *Drugs* 63, 803-843.

Potter, M. (1983). Structural correlates of immunoglobulin diversity. *Survey of immunologic research* 2, 27-42.

Roos, C., Wicovsky, A., Muller, N., Salzmann, S., Rosenthal, T., Kalthoff, H., Trauzold, A., Seher, A., Henkler, F., Kneitz, C., *et al.* (2010). Soluble and transmembrane TNF-like weak inducer of apoptosis differentially activate the classical and noncanonical NF-κB pathway. *J Immunol* 185, 1593-1605.

Roux, K.H., Strelets, L., and Michaelsen, T.E. (1997). Flexibility of human IgG subclasses. *J Immunol* 159, 3372-3382.

Salmon, J.E., Millard, S.S., Brogle, N.L., and Kimberly, R.P. (1995). Fc gamma receptor IIIb enhances Fc gamma receptor IIa function in an oxidant-dependent and allele-sensitive manner. *J Clin Invest* 95, 2877-2885.

- Salzmann, S., Seher, A., Trebing, J., Weisenberger, D., Rosenthal, A., Siegmund, D., and Wajant, H. (2013). Fibroblast growth factor inducible (Fn14)-specific antibodies concomitantly display signaling pathway-specific agonistic and antagonistic activity. *The Journal of biological chemistry* 288, 13455-13466.
- Schmid, R.D., and Hammelehle, R. (2016). Taschenatlas der Biotechnologie und Gentechnik (Wiley VCH Verlag GmbH).
- Schneider, P., Schwenzer, R., Haas, E., Muhlenbeck, F., Schubert, G., Scheurich, P., Tschopp, J., and Wajant, H. (1999). TWEAK can induce cell death via endogenous TNF and TNF receptor 1. *European journal of immunology* 29, 1785-1792.
- Schneider, P., Thome, M., Burns, K., Bodmer, J.L., Hofmann, K., Kataoka, T., Holler, N., and Tschopp, J. (1997). TRAIL receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF-kappaB. *Immunity* 7, 831-836.
- Schroeder, H.W., Jr., and Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol* 125, S41-52.
- Schüler, J. (2016). Die Biotechnologie-Industrie: Ein Einführungs-, Übersichts- und Nachschlagewerk, Vol 1. Auflage (Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag).
- Schur, P.H. (1988). IgG subclasses. A historical perspective. *Monographs in allergy* 23, 1-11.
- Schütt, C.B., Barbara (2011). Grundwissen Immunologie, Vol 3. Auflage (Wiesbaden: Spektrum Akademischer Verlag).
- Sesarman, A., Vidarsson, G., and Sitaru, C. (2010). The neonatal Fc receptor as therapeutic target in IgG-mediated autoimmune diseases. *Cell Mol Life Sci* 67, 2533-2550.
- Shields, R.L., Lai, J., Keck, R., O'Connell, L.Y., Hong, K., Meng, Y.G., Weikert, S.H., and Presta, L.G. (2002). Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fcγ<sub>3</sub> and antibody-dependent cellular toxicity. *The Journal of biological chemistry* 277, 26733-26740.
- Siddiqui, M.Z. (2010). Monoclonal antibodies as diagnostics; an appraisal. *Indian J Pharm Sci* 72, 12-17.
- Smith, M.R. (2003). Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance. *Oncogene* 22, 7359-7368.
- Subedi, G.P., and Barb, A.W. (2015). The Structural Role of Antibody N-Glycosylation in Receptor Interactions. *Structure (London, England : 1993)* 23, 1573-1583.

- Tada, K., Okazaki, T., Sakon, S., Kobarai, T., Kurosawa, K., Yamaoka, S., Hashimoto, H., Mak, T.W., Yagita, H., Okumura, K., *et al.* (2001). Critical roles of TRAF2 and TRAF5 in tumor necrosis factor-induced NF-kappa B activation and protection from cell death. *The Journal of biological chemistry* 276, 36530-36534.
- Tannous, B.A., Kim, D.E., Fernandez, J.L., Weissleder, R., and Breakefield, X.O. (2005). Codon-optimized Gaussia luciferase cDNA for mammalian gene expression in culture and in vivo. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 11, 435-443.
- Thillaivinayagalingam, P., Gommeaux, J., McLoughlin, M., Collins, D., and Newcombe, A.R. (2010). Biopharmaceutical production: Applications of surface plasmon resonance biosensors. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 878, 149-153.
- Trebing, J., Lang, I., Chopra, M., Salzmann, S., Moshir, M., Silence, K., Riedel, S.S., Siegmund, D., Beilhack, A., Otto, C., *et al.* (2014). A novel llama antibody targeting Fn14 exhibits anti-metastatic activity in vivo. *MAbs* 6, 297-308.
- Tutt, A.L., James, S., Laversin, S.A., Tipton, T.R., Ashton-Key, M., French, R.R., Hussain, K., Vaughan, A.T., Dou, L., Earley, A., *et al.* (2015). Development and Characterization of Monoclonal Antibodies Specific for Mouse and Human Fcgamma Receptors. *J Immunol* 195, 5503-5516.
- Vafa, O., Gilliland, G.L., Brezski, R.J., Strake, B., Wilkinson, T., Lacy, E.R., Scallon, B., Teplyakov, A., Malia, T.J., and Strohl, W.R. (2014). An engineered Fc variant of an IgG eliminates all immune effector functions via structural perturbations. *Methods (San Diego, Calif)* 65, 114-126.
- Vallabhapurapu, S., Matsuzawa, A., Zhang, W., Tseng, P.H., Keats, J.J., Wang, H., Vignali, D.A., Bergsagel, P.L., and Karin, M. (2008). Nonredundant and complementary functions of TRAF2 and TRAF3 in a ubiquitination cascade that activates NIK-dependent alternative NF-kappaB signaling. *Nat Immunol* 9, 1364-1370.
- van Dijk, L.K., Boerman, O.C., Kaanders, J.H., and Bussink, J. (2015). Epidermal growth factor receptor imaging in human head and neck cancer xenografts. *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)* 54, 1263-1267.
- Velazquez-Campoy, A., Ohtaka, H., Nezami, A., Muzammil, S., and Freire, E. (2004). Isothermal titration calorimetry. *Current protocols in cell biology Chapter 17*, Unit 17.18.
- Verma, I.M., Stevenson, J.K., Schwarz, E.M., Van Antwerp, D., and Miyamoto, S. (1995). Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes & development* 9, 2723-2735.
- Vidarsson, G., Dekkers, G., and Rispen, T. (2014). IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol* 5, 520.



- Vince, J.E., Chau, D., Callus, B., Wong, W.W., Hawkins, C.J., Schneider, P., McKinlay, M., Benetatos, C.A., Condon, S.M., Chundururu, S.K., *et al.* (2008). TWEAK-FN14 signaling induces lysosomal degradation of a cIAP1-TRAF2 complex to sensitize tumor cells to TNF $\alpha$ . *J Cell Biol* *182*, 171-184.
- Vonderheide, R.H., and Glennie, M.J. (2013). Agonistic CD40 antibodies and cancer therapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *19*, 1035-1043.
- Wajant, H. (2013). The TWEAK-Fn14 system as a potential drug target. *British journal of pharmacology* *170*, 748-764.
- Wajant, H. (2015). Principles of antibody-mediated TNF receptor activation. *Cell Death Differ* *22*, 1727-1741.
- White, A.L., Chan, H.T., French, R.R., Willoughby, J., Mockridge, C.I., Roghanian, A., Penfold, C.A., Booth, S.G., Dodhy, A., Polak, M.E., *et al.* (2015). Conformation of the human immunoglobulin G2 hinge imparts superagonistic properties to immunostimulatory anticancer antibodies. *Cancer Cell* *27*, 138-148.
- Wicovsky, A., Salzmann, S., Roos, C., Ehrenschwender, M., Rosenthal, T., Siegmund, D., Henkler, F., Gohlke, F., Kneitz, C., and Wajant, H. (2009). TNF-like weak inducer of apoptosis inhibits proinflammatory TNF receptor-1 signaling. *Cell Death Differ* *16*, 1445-1459.
- Wiley, S.R., Cassiano, L., Lofton, T., Davis-Smith, T., Winkles, J.A., Lindner, V., Liu, H., Daniel, T.O., Smith, C.A., and Fanslow, W.C. (2001). A novel TNF receptor family member binds TWEAK and is implicated in angiogenesis. *Immunity* *15*, 837-846.
- Willett, C.G., Boucher, Y., di Tomaso, E., Duda, D.G., Munn, L.L., Tong, R.T., Chung, D.C., Sahani, D.V., Kalva, S.P., Kozin, S.V., *et al.* (2004). Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivascular effects in human rectal cancer. *Nat Med* *10*, 145-147.
- Winkles, J.A. (2008). The TWEAK-Fn14 cytokine-receptor axis: discovery, biology and therapeutic targeting. *Nature reviews Drug discovery* *7*, 411-425.
- Wyzgol, A., Muller, N., Fick, A., Munkel, S., Grigoleit, G.U., Pfizenmaier, K., and Wajant, H. (2009). Trimer stabilization, oligomerization, and antibody-mediated cell surface immobilization improve the activity of soluble trimers of CD27L, CD40L, 41BBL, and glucocorticoid-induced TNF receptor ligand. *J Immunol* *183*, 1851-1861.
- Zarnegar, B.J., Wang, Y., Mahoney, D.J., Dempsey, P.W., Cheung, H.H., He, J., Shiba, T., Yang, X., Yeh, W.C., Mak, T.W., *et al.* (2008). Noncanonical NF-kappaB activation requires

coordinated assembly of a regulatory complex of the adaptors cIAP1, cIAP2, TRAF2 and TRAF3 and the kinase NIK. *Nat Immunol* *9*, 1371-1378.

Zheng, C., Kabaleeswaran, V., Wang, Y., Cheng, G., and Wu, H. (2010). Crystal structures of the TRAF2: cIAP2 and the TRAF1: TRAF2: cIAP2 complexes: affinity, specificity, and regulation. *Molecular cell* *38*, 101-113.

Zheng, X., Bi, C., Li, Z., Podariu, M., and Hage, D.S. (2015). Analytical methods for kinetic studies of biological interactions: A review. *J Pharm Biomed Anal* *113*, 163-180.

## 7. Anhang

### 7.1 Sequenzen

Nachfolgend sind beispielhaft die Aminosäuresequenzen der leichten und schweren Ketten von 18D1-IgG1 und GpL<sub>(CT-IC)</sub>-18D1-IgG1 aufgelistet, sowie die Aminosäuresequenzen der variablen Domänen der schweren und leichten Ketten der anderen, in dieser Arbeit verwendeten Antikörper.

#### 1) 18D1-FLAG-V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>-IgG1

Leader (AS 1-28)  
FLAG (AS 29-36)  
**18D1-V<sub>H</sub>** (AS 39-157)  
C<sub>H</sub>-IgG1 (AS 160-491)

1 MNFGFSLIFL VLVLKGVQCE VKLVPRQLDY KDDDDKEFEV QLVESGGGLV QPGGSLRLSC  
 61 AASGFTFSNY WMSWVRQAPG KGLEWVSGIN PGGTSTYYAD SVKGRFTISR DNAKNTLYLQ  
 121 MNSLKSEDTA VYYCAKHLGN WGEYNYWGQG TQVTVSSGSS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS  
 181 GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ  
 241 TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSCDKTHTC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT  
 301 PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRXVSVL TVLHQDWLNG  
 361 KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKQPREP QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD  
 421 IAVEWESNGQ PENNYKTTTP VLDSGDSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFCSS VMHEALHNHY  
 481 TQKSLSLSPG K-

#### 2) 18D1-FLAG-V<sub>L</sub>-C<sub>L</sub>

Leader (AS 1-28)  
FLAG (AS 29-36)  
**18D1-V<sub>L</sub>** (AS 39-149)  
C<sub>L</sub>-IgG1 (AS 152-261)

1 MNFGFSLIFL VLVLKGVQCE VKLVPRQLDY KDDDDKEFQS ALTQPPSVSG SPGKTVTISC  
 61 AGTGGDVGYR NSVSWYQQLP GMAPKLLIYD VDKRASGITD RFSGSKSGDT ASLTISGVQS  
 121 EDEADYYCAS QRSGLIAAVFG GGTHLTVLGG SEIKRTVAAP SVFIFPPSDE QLKSGTASVV  
 181 CLLNMFYPRE AKVQWKVDNA LQSGNSQESV TEQDSKDSTY SLSSTLTLSK ADYEKHKVYA  
 241 CEVTHQGLSS PVTKSFNRGE C-

#### 3) 18D1-FLAG-V<sub>L</sub>-C<sub>L</sub>-GpL

Leader (AS 1-28)  
FLAG (AS 29-36)  
**18D1-V<sub>L</sub>** (AS 39-149)  
C<sub>L</sub>-IgG1 (AS 152-261)  
**GpL** (AS 264-431)

1 MNFGFSLIFL VLVLKGVQCE VKLVPRQLDY KDDDDKEFQS ALTQPPSVSG SPGKTVTISC  
 61 AGTGGDVGYR NSVSWYQQLP GMAPKLLIYD VDKRASGITD RFSGSKSGDT ASLTISGVQS  
 121 EDEADYYCAS QRSGLIAAVFG GGTHLTVLGG SEIKRTVAAP SVFIFPPSDE QLKSGTASVV  
 181 CLLNMFYPRE AKVQWKVDNA LQSGNSQESV TEQDSKDSTY SLSSTLTLSK ADYEKHKVYA  
 241 CEVTHQGLSS PVTKSFNRGE CLEKPTENNE DFNIVAVASN FATTDLADR GKLPKGLPL  
 301 EVLKEMEANA RKAGCTRGCL ICLSHIKCTP KMKKFIPIGRC HTYEGDKESA QGGIGEIVD  
 361 IPEIPGFKDL EPMEQFIAQV DLCVDCTTGC LKGLANVOCS DLLKKWLPQR CATFASKIQG  
 421 QVDKIKGAGG D-

**4) BHA10-FLAG-V<sub>H</sub>**

Leader (AS 1-28)  
FLAG (AS 29-36)  
**BHA10-V<sub>H</sub>** (AS 39-154)

1 MNFGFSLIFL VLVLKGVQCE VKLVPRQLDY KDDDDKEFQV QLVQSGAEVK KPGSSVKVSC  
 61 KASGYTFTTY YLHWVRQAPG QGLEWGWYI PGNVHAQYNE KFKGRVTITA DKSTSTAYME  
 121 LSSLRSEDTA VYYCARSWEG FPYWGQTTV TVSS-

**5) BHA10-FLAG-V<sub>L</sub>**

Leader (AS 1-28)  
FLAG (AS 29-36)  
**BHA10-V<sub>L</sub>** (AS 39-145)

1 MNFGFSLIFL VLVLKGVQCE VKLVPRQLDY KDDDDKEFDI QMTQSPSSLS ASVGDRVTIT  
 61 CKASQNVGIN VAWYQKPKG APKSLISSAS YRYSGVPSRF SGSGSGTDFT LTISSLQPED  
 121 FATYFCQOYD TYPFTFGQGT KVEIK-

**6) E09-FLAG-V<sub>H</sub>**

Leader (AS 1-28)  
FLAG (AS 29-36)  
**E09-V<sub>H</sub>** (AS 39-163)

1 MNFGFSLIFL VLVLKGVQCE VKLVPRQLDY KDDDDKEFQL QLQESGPGLV KPSETLSLTC  
 61 TVSGASISAN SYYGWVRQS PGKLEWVGS IAYRGNSNSG STYYNPSLKS RATVSVDTSK  
 121 NQVSLRLTSV TAADTALYYC ARRQLLDDGT GYQWAAFDVW GQG-

**7) E09-FLAG-V<sub>L</sub>**

Leader (AS 1-28)  
FLAG (AS 29-36)  
**E09-V<sub>L</sub>** (AS 39-149)

1 MNFGFSLIFL VLVLKGVQCE VKLVPRQLDY KDDDDKELQS VLTQPPSVSE APRQTVTISC  
 61 SGNSFNIGRY PVNWWYQLPG KAPKLLIYYN NLRFSGVSDR FSGSKSGTSA SLAIRDLLSE  
 121 DEADYYCSTW DDTLKGWVFG GGTKVTVLG-

**8) G28.5-FLAG-V<sub>H</sub>**

Leader (AS 1-28)  
FLAG (AS 29-36)  
**G28.5-V<sub>H</sub>** (AS 39-150)

1 MNFGFSLIFL VLVLKGVQCE VKLVPRQLDY KDDDDKELDI QLQQSGPGLV KPSQSLSLTC  
 61 SVTGYSITTN YNWNWIRQFP GNKLEWGYI RYDGTSEYTP SLKNRVSITR DTSMNQFFLR  
 121 LTSVTPEDTA TYYCARLDYW GQGTTLTVSS-

**9) G28.5-FLAG-V<sub>L</sub>**

Leader (AS 1-28)  
FLAG (AS 29-36)  
**G28.5-V<sub>L</sub>** (AS 39-150)

1 MNFGFSLIFL VLVLKGVQCE VKLVPRQLDY KDDDDKELDI VMTQNPLSLP VSLGDEASIS  
 61 CRSSQSLENS NGNTFLNWWF QKPGQSPQLL IYRVSNRFSG VPDRFSGSGS GTDFTLTKISR  
 121 VEAEDLGVYF CLQVTHVPYT FGGGTTLEIK-

## 7.2 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Ampere
Abb.	Abbildung
ADCC	<i>antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i>
AS	Aminosäure
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Caspase	<i>cysteiny aspartat specific proteinase</i>
CD	<i>cluster of Differentiation</i>
CDC	<i>complement-dependent cytotoxicity</i>
CDR	<i>complementarity determining region</i>
CHX	Cycloheximid
CIAP	<i>calf intestine alkaline phosphatase</i>
clAP	<i>cellular inhibitor of apoptosis protein</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CRD	<i>cysteine-rich domain</i>
C <sub>H</sub> , C <sub>L</sub>	<i>immunoglobulin constant region (heavy or light chain)</i>
d.h.	das heißt
Da	Dalton
DC	<i>dendritic cell</i>
DD	<i>death domain; Todesdomäne</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
etc.	<i>et cetera</i>
Fab	<i>fragment antigen binding</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FADD	<i>Fas-associated protein with death domain</i>
Fc	<i>fragment crystallisable</i>
FCS	fetales Kälberserum
FcγR	Fc-Gamma-Rezeptor
FLAG	Polypeptid Protein-Tag (DYKDDDDK)
Fn14	<i>fibroblast growth factor-inducible 14</i>
g	Gramm
G418	<i>geneticin disulfate</i>

---

GCE	<i>genetic code expansion</i>
GpL	<i>Gaussia princeps</i> Luziferase
h	Stunde(n)
HCl	Chlorwasserstoff; Salzsäure
(h)MW	<i>(high) molecular weight</i>
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
ICT	<i>isothermal titration calorimetry</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
I $\kappa$ B	<i>inhibitor of <math>\kappa</math>B</i>
IKK	<i>I<math>\kappa</math>B kinase</i>
IL	Interleukin
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
ITIM	<i>immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif</i>
K48	Lysin 48
k	Kilo
K <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante
K <sub>i</sub>	K <sub>D</sub> -Wert des Kompetitors
KO	<i>knockout</i>
l	Liter
m	milli
M	Molarität (Mol/Liter)
M2	anti-FLAG mAB
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
min	Minuten
mol	Stoffmenge
Mrd.	Milliarde(n)
N297	Asparagin 297
n	nano
n.s.	<i>nonspecific</i>
ncAA	<i>non-canonical amino acid</i>
NEMO	<i>NF<math>\kappa</math>B essential modulator</i>
NF $\kappa$ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
p	pico
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PE	Phycoerythrin
PLAD	<i>pre-ligand assembly domain</i>

RIP	<i>receptor-interacting protein 1</i>
RHD	<i>rel homology domain</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RS	Aminoacyl-tRNA-Synthetase
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel</i>
SPR	<i>surface plasmon resonance spectroscopy</i>
Tab.	Tabelle
TAB	<i>TAK1-binding protein</i>
TAK1	<i>transforming growth factor <math>\beta</math>-activated kinase 1</i>
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
THD	<i>TNF homology domain</i>
TNC	Tenascin-C
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TNFR	<i>tumor necrosis factor receptor</i>
TNFSF	<i>tumor necrosis factor superfamily</i>
TNFRSF	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily</i>
TRADD	<i>TNFR1 associated death domain protein</i>
TRAIL	<i>tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand</i>
TRAF	<i>TNFR associated factor</i>
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TWEAK	<i>tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis</i>
Tween	<i>polyoxyethylen-sorbitan-monolaurate</i>
UV	ultraviolett
V	Volt
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	<i>vascular endothelial growth factor receptor</i>
V <sub>H</sub> , V <sub>L</sub>	<i>immunoglobulin variable region (heavy or light chain)</i>
v/v	<i>volume/volume percent</i>
w/o	<i>without leader</i>
w/v	<i>weight/volume percent</i>
zVAD-fmk	<i>N-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethyl-keton</i>
$\alpha$	anti
$\gamma$	gamma
$\mu$	micro

---

## Publikationen

Siegmund D, Kums J, Ehrenschwender M, Wajant H. Activation of TNFR2 sensitizes macrophages for TNFR1-mediated necroptosis. *Cell death & disease* 2016; 7:e2375.

Chopra M, Biehl M, Steinfatt T, Brandl A, Kums J, Amich J, et al. Exogenous TNFR2 activation protects from acute GvHD via host T reg cell expansion. *The Journal of experimental medicine* 2016; 213:1881-900.

Lang I, Kums J, Wajant H. Generation and Application of Bioluminescent CD95 Ligand Fusion Proteins. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* 2017; 1557:63-77.

Kums J, Nelke J, Ruth B, Schafer V, Siegmund D, Wajant H. Quantitative analysis of cell surface antigen-antibody interaction using Gaussia princeps luciferase antibody fusion proteins. *MAbs* 2017:0.



---

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Wajant dafür bedanken, dass ich meine Doktorarbeit unter seiner wissenschaftlichen Leitung und Betreuung am Institut für Molekulare Innere Medizin des Universitätsklinikums Würzburg anfertigen durfte. Danke für die ideenreichen Ratschläge und Hilfestellungen bei den aufgetretenen Problemen während meiner Promotion.

Ebenso möchte ich Herrn Prof. Dr. Müller danken, der meine Arbeit als Zweitgutachter betreut hat.

Ein großer Dank gilt meinen ehemaligen und jetzigen Kollegen aus der AG Wajant für die tolle Zusammenarbeit und für die schöne Atmosphäre sowohl im als auch außerhalb des Labors. Besonders möchte ich an dieser Stelle Tina danken, für die Einarbeitung in eigentlich ALLE Techniken, die ich im Labor gebraucht habe und für deine unendliche Hilfsbereitschaft. Außerdem ein dickes Dankeschön an meine fleißigen „Korrekturleser“. ☺

Zuletzt und ganz besonders möchte ich meiner Familie und meinem Verlobten Dave danken, für die fortwährende Unterstützung und Motivation während meines Studiums und meiner Promotion.