

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
der Universität Würzburg
Abteilung für Molekulare Innere Medizin
Leiter der Abteilung: Prof. Dr. Harald Wajant**

Entwicklung neuer Antikörper Fusionsproteine

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Moritz Rothaug

aus Salz

Würzburg, Januar 2018

Referent/Referentin: Prof. Dr. Harald Wajant

Koreferent/Koreferentin: Prof. Dr. Dr. Andreas Beilhack

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 20.02.2019

Der Promovend ist Zahnarzt

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation „Entwicklung neuer Antikörper Fusionsproteine“ eigenständig, d.h. insbesondere selbstständig mit Einhaltung der Regeln über gute wissenschaftliche Praxis und ohne Hilfe einer kommerziellen Promotionsberatung angefertigt, sowie 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 (Moritz Rothaug)

Affidavit

I hereby confirm that my dissertation entitled „Entwicklung neuer Antikörper Fusionsproteine“ is the result of my own work without help or support from commercial consultants. All sources and materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Würzburg,

Date

Signature (Moritz Rothaug)

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 8. Februar bis 30. Dezember 2017 in der Abteilung für Molekulare Innere Medizin der Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter der Anleitung von Prof. Dr. Harald Wajant angefertigt.

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung	III
Affidavit	III
Inhaltsverzeichnis	IV
1. Einleitung	1
1.1. Antikörper	1
1.1.1. Struktur von IgG-Antikörpern	1
1.1.2. Antikörper induzierte Signaltransduktion	4
1.2. Die Tumor Nekrose Faktor Superfamilie	6
1.2.1. Rezeptoren der TNF Superfamilie	6
1.2.1.1. Todesrezeptoren	7
1.2.1.2. TRAF-interagierende TNFRSF-Rezeptoren	9
1.2.1.3. Decoy-Rezeptoren	11
1.2.2. Aktivierung von Rezeptoren der TNFR-Superfamilie	12
1.3. Der Transkriptionsfaktor NFκB	16
1.3.1. Der klassische NFκB-Signalweg	18
1.3.2. Der alternative NFκB-Signalweg	19
1.4. Zielsetzung der Arbeit	21
2. Materialien	22
2.1. Chemikalien, Reagenzien und Zellkulturmedien	22
2.2. Enzyme	23
2.3. Antikörper	23
2.4. Kommerzielle Kits	23
2.5. Geräte, Verbrauchs- und Labormaterial	23
2.6. Lösungen und Puffer	25
2.7. Verwendete Zelllinien	26

3. Methoden	28
3.1. Klonierung der schweren und leichten Ketten	28
3.2. Zellkultur	29
3.3. Produktion der Antikörper	29
3.4. Anti-FLAG-Affinitätschromatographie	30
3.5. Western Blot	30
3.6. Silberfärbung	31
3.7. IL-8 Elisa	32
3.8. Zytotoxizitätsassay	33
3.9. Durchflusszytometrie	34
4. Ergebnisse	35
4.1. Klonierung der neuen Antikörper und Antikörper-Fusionsproteine	35
4.2. Produktion	37
4.3. Funktionsüberprüfung der ungereinigten Antikörper-Fusionsproteine	41
4.3.1. Überprüfung der CD70-abhängigen Antikörper-vermittelten Rezeptoraktivierung anhand in HEK293 Ko-Kulturen	41
4.3.2. Überprüfung der CD70-abhängigen Antikörper vermittelten Rezeptoraktivierung mittels endogen CD70-exprimierender Tumorzelllinien	43
4.3.3. CD70-abhängige anti-Fas-Antikörper-vermittelte Rezeptoraktivierung	45
4.3.4. Vergleich von Antikörperfusionsproteinen mit scFv:CD70 in unterschiedlicher Anzahl und an verschiedenen Positionen	48
4.4. Analyse der CD70-abhängigen Aktivität der gereinigten Fab ₂ -Antikörper- Fusionsproteine	50
4.5. Untersuchung der CD70-abhängigen Rezeptoraktivierung anhand verschiedener CD70-exprimierender Ko-Kulturzellen	53
5. Diskussion	57
6. Zusammenfassung	62
7. Literaturverzeichnis	64

8. Abbildungsverzeichnis	71
9. Anhang	73
9.1. DNA-Sequenzen	73
9.2. Abkürzungsverzeichnis	77
Danksagung	
Lebenslauf	

1. Einleitung

1.1 Antikörper

Antikörper, auch Immunglobuline (Ig) genannt, werden von B-Zellen sowohl in Form von Rezeptoren (Zelloberflächenimmunglobulinmoleküle) als auch als lösliche Moleküle produziert. Der Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen regt die B-Zelle zur Reifung an und sie erhöht ihre Antikörperproduktion (Mulisch 2013).

Antikörper erfüllen diverse Aufgaben. Manche Antikörper binden spezifisch an Pathogene, wie zum Beispiel Viren oder Bakterien, und markieren diese für lytische, zytotoxische oder phagozytische Prozesse. Werden körpereigene Antigene für diese Prozesse erfasst, kann es zu einer Autoimmunkrankheit kommen (Kaufmann 2014). Antikörper können in ihrer löslichen Form auch über die Bindung an zellgebundene Zielmoleküle, z.B. Rezeptoren, wirken und letztere z.B. blockieren oder aktivieren (Lutterotti and Martin 2008, Hansel, Kropshofer et al. 2010, Stevenson 2014, Lee and Im 2017).

Aufgrund dieser vielfältigen Wirkung sind Antikörper in der medikamentösen Therapie für diverse Krankheitsbilder die am stärksten wachsende Gruppe und Therapeutika (Waldmann 2003, Lonberg 2005, Lee and Im 2017).

1.1.1 Struktur von IgG-Antikörpern

Die natürlich im menschlichen Körper vorkommenden Antikörper lassen sich in fünf Klassen (IgA, IgD, IgE, IgG und IgM) einteilen. Diese bestehen je nach Klasse zu 4-18 % aus Kohlenhydraten und zu 82-96 % aus Protein. Die AK-Klassen unterscheiden sich in der Struktur der schweren Kette und in ihrer Effektor-Funktion. IgG bildet mit circa 80 % den weitaus größten Teil der Immunglobuline. Die IgG Antikörper lassen sich weiter in vier Untergruppen einteilen: IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4. Dieser Einteilung liegt der jeweilige prozentuale Anteil im Serum zugrunde. Sie unterscheiden sich zum Beispiel in der Länge der *hinge*-Region, auch Gelenkregion genannt. Dort werden die schweren Ketten mit einer

unterschiedlichen Anzahl an Di-Sulfidbrücken verbunden (Schur 1988, Liu and May 2012, Vidarsson, Dekkers et al. 2014).

Die wichtigste Effektor-Funktion der IgG-Antikörper ist die Bindung an die Fc γ -Rezeptoren. Diese sind eine Familie von Rezeptoren in der Zellmembran von Leukozyten. Über ihren Fc-Teil binden die IgG-Antikörper spezifisch an diese Rezeptoren, lösen so zelluläre Reaktionen aus und verbinden somit das adaptive mit dem angeborenen Immunsystem (Kapur, Einarsdottir et al. 2014).

In der medikamentösen Therapie werden zum größten Teil IgG-Antikörper verwendet, aufgrund ihres akzeptablen Molekulargewichts von ca. 150 kDa, ihrer *in vivo* Stabilität und ihrer sehr guten Effektor-Funktion. Ein weiterer Grund liegt in ihrer vergleichsweise leichten Produzierbarkeit (Liu, Pop et al. 2008).

Strukturell besteht ein IgG-Antikörper aus zwei Kopien von je zwei Protein-Kohlenhydrat-Ketten, der leichten Kette mit circa 24 kDa und der schweren Kette mit circa 55 kDa. Die Kettenpaare bilden eine dreidimensionale Struktur in Y-Form. Sie kann in drei Domänen unterteilt werden: zwei identische Fab-Teile und einen Fc-Teil, die durch eine flexible *hinge*-Region miteinander verbunden sind (Wang, Mathieu et al. 2017).

Die schwere Kette kann in vier Regionen aufgeteilt werden, drei konstante (*constant heavy*; C_{H1}, C_{H2} und C_{H3}) und eine N-terminale variable (*variable heavy*; V_H). In der leichten Kette hingegen werden nur zwei Regionen unterschieden, je eine konstante (*constant light*; C_L) und eine N-terminale variable (*variable light*; V_L). Dabei besteht das Fc-Fragment aus einem Dimer der schweren Ketten Regionen C_{H2} und C_{H3}. Das Fab-Fragment besitzt sowohl Anteile der schweren Kette, C_{H1} und V_H, als auch die komplette leichte Kette mit C_L und V_L (Jefferis and Kumararatne 1990, Phillips, Tao et al. 1994, Roux, Strelets et al. 1997, Stanfield and Wilson 2014, Kums 2017).

Beide Fab-Fragmente können am N-terminalen Ende ein Antigen binden, also über die variablen Domänen. Die enorme Sequenzvarianz und damit die Spezifität der Antikörper-Antigen-Bindung kommt über je drei hypervariable Regionen in der

variablen Region zustande, den CDRs (*complementarity determining regions*) (Sesarman, Vidarsson et al. 2010, Kums 2017).

Dieser Variabilität liegt eine genetische Rekombination zugrunde, die für die schwere Kette V(D)J- oder für die leichte Kette VJ-Rekombination genannt wird. Hier sind alle Kombinationen aus vielen verschiedenen V, D und J Gen-Segmenten möglich, die in unterschiedlicher Weise und mit verschiedenen Übergängen rekombiniert werden, so dass theoretisch circa eine Million verschiedene Sequenz-Kombinationen entstehen können (Saini, Allore et al. 1999, Stanfield and Wilson 2014, Stanfield, Wilson et al. 2016).

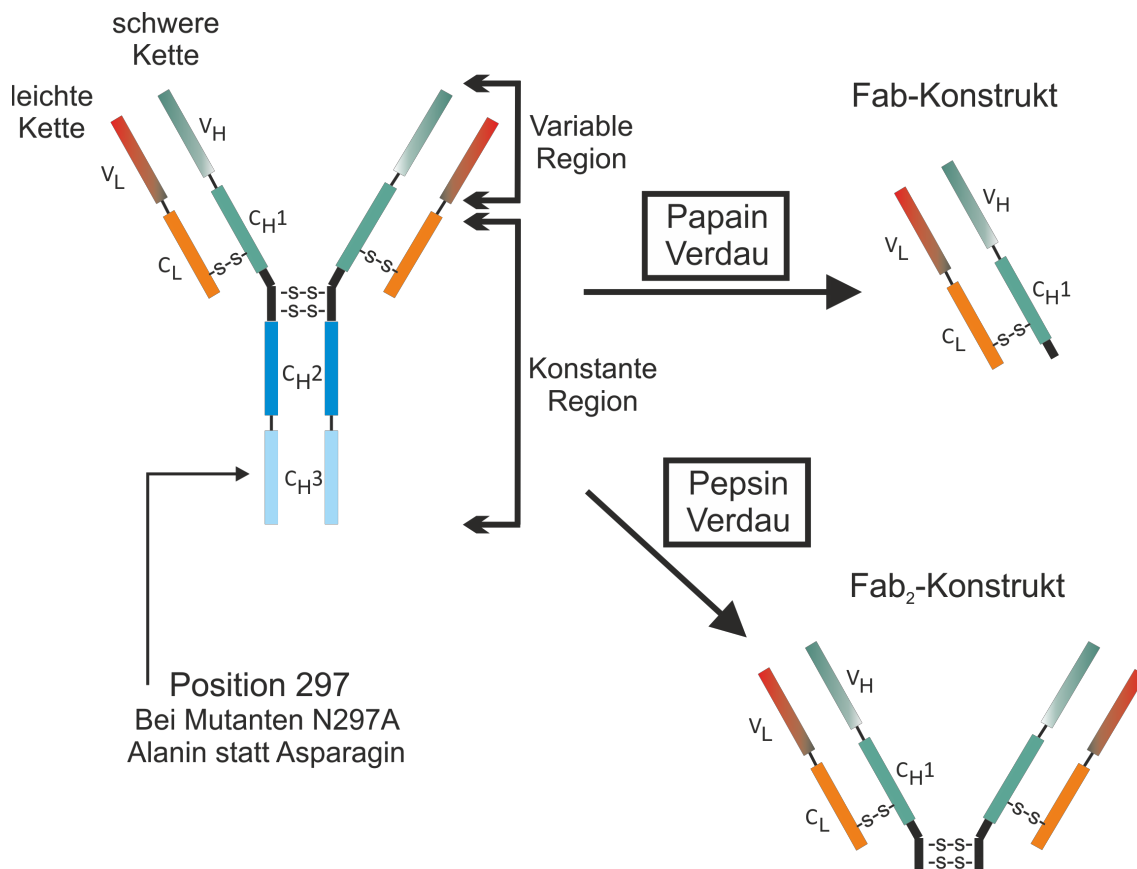


Abbildung 1: Schematischer Aufbau von IgG Antikörpern

Struktureller Aufbau eines humanen IgG1 Antikörpers. Dieser besteht aus je zwei schweren und leichten Ketten. Die leichten Ketten können in V_L und C_L eingeteilt werden, die schweren Ketten in die Unterabschnitte V_H, C_H1, C_H2 und C_H3. Über die variablen Domänen V_L und V_H erfolgt die Antigenbindung. Durch eine proteolytische Spaltung mithilfe des Enzyms Papain kann ein Fab-Konstrukt entstehen, mithilfe von Pepsin ein Fab₂-Konstrukt, welches noch beide Antigenbindestellen besitzt. Durch

Austausch der Aminosäure Asparagin gegen Alanin an Aminosäureposition 297 entsteht der Mutant N297A.

CH1-CH3: konstante Region der schweren Kette

VH: variable Region der schweren Kette

CL: konstante Region der leichten Kette

VL: variable Region der leichten Kette

-S-S-: Disulfidbrücke

Fab: Fragment antigen binding

Das bereits beschriebene Fab-Fragment, beziehungsweise das Fab₂-Fragment, kann durch proteolytische Spaltung vom Fc-Teil getrennt werden. Das Enzym Papain spaltet den Antikörper aminoterminal der Disulfidbrücken der *hinge*-Region in drei Teile, wobei die zwei Fab-Fragmente identisch sind. Eine andere Protease, Pepsin, hat einen ähnlichen Effekt, jedoch erfolgt die Spaltung C-terminal der *hinge*-Region, sodass die Fab-Fragmente verbunden bleiben und ein Fab₂ Fragment entsteht (Abb.1). Dieses ist wie der parentale Antikörper in der Lage, zwei Antigene zu binden, jedoch wurde durch den Verdau das Fc-Fragment entfernt, wodurch keine Aktivierungen von immunkompetenten Zellen mehr möglich sind (A. Janeway 1994). Ebenso wird die durch den Fc-Teil vermittelte Halbwertszeit im Serum (vorher circa 21 Tage) verkürzt (Vidarsson, Dekkers et al. 2014).

Eine weitere Möglichkeit, die Bindung an Fc-Rezeptoren zu stören oder zu inhibieren, liegt im Einführen von Mutationen im konstanten Teil der schweren Kette. Exemplarisch hierfür ist der Leucin (L) zu Alanin (A) Wechsel an der Aminosäureposition 234 und 235 (LALA). Ein weiteres Beispiel ist die auch in dieser Arbeit verwendete N297A-Mutante, bei welcher an Position 297 die Aminosäure Asparagin (N) gegen Alanin (A) getauscht wird. (Wines, Powell et al. 2000, Chao, Ma et al. 2009, Arduin, Arora et al. 2015)

1.1.2 Antikörper induzierte Signaltransduktion

Wie bereits beschrieben, erfüllen Antikörper diverse Aufgaben. Neben ihrer nativen Funktion, pathogene Antigene zu erkennen, wurden sich die spezifischen Bindefähigkeiten von Antikörpern zunutze gemacht, um gezielt Rezeptormoleküle

zu adressieren (Moran, Kovacsovics-Bankowski et al. 2013, Ye, Fox et al. 2017). Dabei werden grob agonistische und antagonistische Antikörper unterschieden. Während agonistische Antikörper den Rezeptor aktivieren, an den sie binden und somit die mit dem Rezeptor verbundenen Signalkaskaden auslösen, blockieren antagonistische Antikörper die Liganden-Bindungsstelle von Rezeptoren, so dass entsprechende Liganden nicht binden können und keine rezeptorvermittelte Signaltransduktion eingeleitet werden kann (Schütt 2011, Kums 2017).

Agonistische Antikörper sind besonders im Hinblick auf die Tumorthherapie von großem Interesse. Die hier vorhandenen Möglichkeiten der Rezeptoraktivierung stellen einen interessanten Therapieansatz zur Behandlung von Neoplasien dar. Zum einen stehen die Todesrezeptoren der TNFRSF (*Tumor necrosis factor receptor superfamily*) als Angriffspunkt für agonistische Aktivierung mithilfe von Antikörpern zur Verfügung. Hierbei ist vor allem der in dieser Arbeit verwendete TNFRSF Rezeptor CD95 hervorzuheben, sowie TRAIL (*tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand*) receptor 1, TRAIL receptor 2 und der TNFR1, einer der Rezeptoren des namensgebenden Zytokins TNF α deren Aktivierung Apoptose induzieren kann (Krammer 2000, Debatin and Krammer 2004).

Zum anderen gibt es in der Tumorthherapie agonistische Antikörper, die ihre Wirkung nicht über eine proapoptotische Wirkung erzielen, sondern über eine Aktivierung der adaptiven Immunantwort, um die entarteten Zellen besser zu erkennen und zu eliminieren. An dieser Stelle kann der in dieser Arbeit verwendete CD40-gerichtete Antikörper als Beispiel genannt werden. CD40 ist ebenfalls ein Mitglied der Tumornekrosefaktor Rezeptor Superfamilie, allerdings kein Todesrezeptor, und wird weitgehend auf APCs (*antigen-presenting cells*) exprimiert, wie zum Beispiel auf dendritischen Zellen, B-Lymphozyten oder Monozyten. Es wurde gezeigt, dass agonistische monoklonale anti-CD40 Antikörper APCs aktivieren und die anti-Tumor Antwort der T-Leukozyten fördern. Durch diesen Mechanismus können Tumorzellen leichter vom Immunsystem als solche erkannt und anschließend eliminiert werden (Grewal and Flavell 1998, van Kooten and Banchereau 2000, Eliopoulos and Young 2004, Vonderheide and Glennie 2013).

1.2 Die Tumor Nekrose Faktor Superfamilie

Der Tumor Nekrose Faktor (TNF) ist ein pleiotrop wirkendes Zytokin, welches eine zentrale Rolle in diversen immunregulatorischen Vorgängen im menschlichen Körper spielt, wie zum Beispiel bei Entzündungen oder bei der Abwehr körperfremder Pathogene. TNF ist der Namensgeber einer strukturell verwandten Familie von Liganden. Hierbei können unterschiedliche Mitglieder der Familie unterschiedliche Effekte hervorrufen, wie unter anderem Apoptose, Nekroptose, Immunzellaktivierung oder Zellproliferation (Wajant 2009). Über die Liganden und Rezeptoren der TNF-Superfamilie kommunizieren verschiedene Zelltypen während der Entwicklung, speziell in der Haut, im Knochen und in den lymphatischen Organen (Sedy, Bekiaris et al. 2014, Ward-Kavanagh, Lin et al. 2016).

Forschungen während der letzten drei Jahrzehnte haben ergeben, dass zu der TNF Superfamilie 19 verschiedene Liganden und 29 Rezeptoren gehören (Aggarwal 2003).

1.2.1 Rezeptoren der TNF Superfamilie

Ein Rezeptor ist ein Protein oder ein Proteinkomplex, an den Liganden oder Signalmoleküle binden können, wodurch in der Regel gut definierte Signalwege im Zellinneren ausgelöst werden. Es gibt sowohl membrangebundene als auch frei im Zytosol befindliche Rezeptoren. Charakteristisch ist die nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip funktionierende spezifische Bindungsstelle für den zugehörigen Liganden.

TNF-Rezeptoren bestehen typischerweise aus einer extrazellulären Domäne, die für die spezifische Ligandenbindung zuständig ist, und einer intrazellulären Domäne, die die Aktivierung des Signalwegs vermittelt (Locksley, Killeen et al. 2001, Aggarwal 2003, Li, Yin et al. 2013). Sie sind bis auf wenige Ausnahmen (z.B. XEDAR, welches ein Typ III Transmembranprotein ist) Typ I Transmembranproteine. Die Sequenzen der extrazellulären Domänen der

verschiedenen Rezeptoren haben dabei eine sehr große Ähnlichkeit (Smith, Farrah et al. 1994, Locksley, Killeen et al. 2001).

Der transmembrane Anteil des Rezeptors besteht aus 20 bis 30 Aminosäuren und liegt in einer α -Helix als Sekundärstruktur vor. Er durchquert die Plasmamembran als Singlepass-Transmembranprotein (Bodmer, Schneider et al. 2002, Geiger 2017). Das Hauptmerkmal der Rezeptoren der TNF-Rezeptor-Superfamilie (TNFRSF) sind cysteinreiche Pseudowiederholungen (*cysteine rich domain*, CRD), die rund 40 Aminosäuren umfassen, von denen circa sechs Cystein sind. Diese werden typischerweise mit drei Disulfidbrücken verbunden. Die Anzahl der CRDs variiert rezeptorabhängig von eins bis vier oder sogar sechs. Über die CRDs erfolgt die Bindung der Liganden (Smith, Farrah et al. 1994, Chan, Chun et al. 2000, Bodmer, Schneider et al. 2002).

Die Effekte, die die Aktivierung der Rezeptoren der TNF Superfamilie nach sich ziehen, sind von Rezeptor zu Rezeptor unterschiedlich. So fördern manche Mitglieder der Familie die Proliferation von Zellen, während andere den programmierten Zelltod induzieren können. Bei wiederum anderen konnte gezeigt werden, dass sie eine Rolle in der morphologischen Entwicklung und Differenzierung spielen. Allerdings haben eigentlich alle Mitglieder der TNFRSF eine proinflammatorische Wirkung über die Aktivierung des NF κ B-Signalweges. So haben die meisten Rezeptoren sowohl eine begünstigende, als auch eine potentiell nachteilige Auswirkung (Tartaglia, Ayres et al. 1993, Aggarwal 2003, Bhardwaj and Aggarwal 2003, Gaur and Aggarwal 2003, Aggarwal, Gupta et al. 2012).

Strukturell lässt sich die TNFR-Superfamilie in drei Untergruppen einteilen: In diejenigen, die eine Todesdomäne besitzen und mit dem Zelltod assoziiert sind, in Köderrezeptoren ohne Signalübertragung und in TRAF-interagierende TNF-Rezeptoren (Bullock 2017).

1.2.1.1 Todesrezeptoren

Der Name „Todesrezeptor“ wurde erstmals 1997 eingeführt, um die Apoptose-induzierenden TNF Rezeptoren der TNFRSF zu beschreiben. Dazu zählen heute

acht verschiedene Rezeptoren: *Tumor necrose faktor receptor 1* (TNFR1), *cluster of differentiation 95* (CD95), *death receptor 3* (DR3), *tumor necrose faktor-related apoptosis-inducing-ligand-receptor 1* (TRAILR1), *tumor necrose faktor-related apoptosis-inducing-ligand-receptor 2* (TRAILR2), *p75-nerve.growth factor receptor* (p75NGFR), *ectodysplasin A receptor* (EDAR) und *death receptor 6* (DR6) (siehe Abbildung 2). Diese Rezeptoren sind durch eine Protein-Protein-Wechselwirkungs-Domäne in ihrem intrazellulären Abschnitt in der Lage, Apoptose zu induzieren. Diese wird *death domain* genannt (DD) (Wajant 2003, Siegmund, Lang et al. 2017).

Die Todesrezeptoren lassen sich wiederum in Untergruppen einteilen, entsprechend dem zellulären Mechanismus, über welchen sie Apoptose, beziehungsweise Nekroptose, induzieren. CD95, TRAILR1 und TRAILR2 aktivieren Caspase-8 über einen Plasmamembran-assoziierten Komplex namens DISC (*death-inducing signaling complex*), welcher Procaspase-8 in die Apoptose induzierende reife heterotetramere Caspase-8 konvertiert. Dies geschieht über FADD (*Fas-associated death domain*), ein Adaptorprotein, das eine DD besitzt. TNFR1 und DR3 nutzen ebenfalls FADD und Caspase-8, um Apoptose zu induzieren, allerdings wird die FADD-abhängige Entstehung von Caspase-8 mit Hilfe des Todesdomäne enthaltenden Proteins RIP (receptor-interacting protein) im Zytoplasma durchgeführt. Bei den verbleibenden Rezeptoren p75NGFR, EDAR und DR6 lässt sich bis jetzt kein Rückschluss auf FADD und Caspase-8 induzierte Apoptose ziehen. Bei diesen drei Rezeptoren ist der Mechanismus der Apoptoseinduktion noch nicht geklärt (Fesik 2000, Holler, Zaru et al. 2000, Wajant 2003, Wang, Du et al. 2008, Siegmund, Lang et al. 2017).

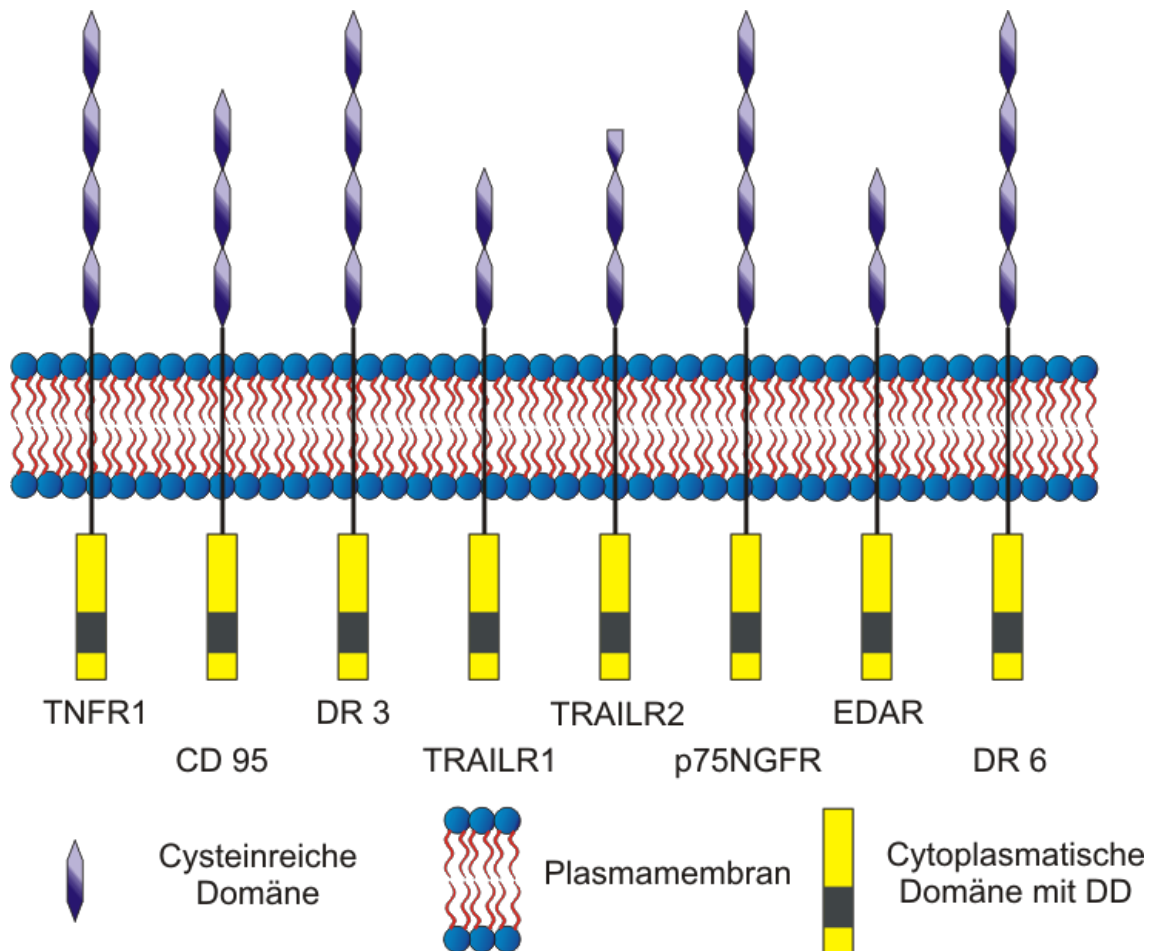


Abbildung 2: Schematische Darstellung der TNFRSF Todesrezeptoren

Abgebildet sind die 8 Todesrezeptoren. Charakteristisch für die TNFRSF Rezeptoren sind die Cysteinreichen Domänen in Rezeptor abhängiger Anzahl. Im cytoplasmatischen Teil des Todesrezeptors befindet sich zudem die für diese Subgruppe typische death domain.

1.2.1.2 TRAF-interagierende TNFRSF-Rezeptoren

TRAF (TNFR associated factor)-interagierende TNFRSF-Rezeptoren besitzen, wie auch die Todesrezeptoren, die für die TNFRSF typischen cysteinreichen Domänen, unterscheiden sich aber von diesen im cytoplasmatischen Abschnitt. Sie beinhalten dort keine DD sondern ein oder mehrere TRAF-bindende Motive. Letztere sind Abschnitte von wenigen Aminosäuren im intrazellulären Teil des Rezeptors. Ihre Aktivierung hat somit keine Apoptose zur Folge, sondern aktiviert unterschiedliche Signalkaskaden im Zellinneren, wie zum Beispiel den NFκB-

Signalweg (Rothe, Wong et al. 1994, Wajant, Grell et al. 1999, Locksley, Killeen et al. 2001). Als Beispiel für die TRAF-interagierenden TNFRSF-Rezeptoren können die in dieser Arbeit vorkommenden Rezeptoren CD40 und CD27 genannt werden (Abb. 3).

CD40 kommt auf B-Zellen, Monozyten, dendritischen Zellen, Endothel- und Epithelzellen vor (van Kooten and Banchereau 2000, Kumar, Abbas et al. 2013). Der Rezeptor spielt eine wichtige Rolle in der Regulierung der Immunantwort (van Kooten and Banchereau 2000). So können über CD40 ruhende B-Zellen aktiviert werden. Dies zeigt sich in einer Zunahme der Größe dieser Zellen. Diese aktivierten B-Zellen sekretieren dann verschiedene Zytokine, unter anderem IL-4, IL-13 oder IL-10. IL-10 wiederum kann eine gesteigerte Sekretion von Immunglobulinen hervorrufen. Eine CD40 Aktivierung auf Monozyten oder dendritischen Zellen resultiert ebenfalls in einer Sekretion von verschiedenen Zytokinen wie IL-1, IL-8 oder auch IL-10, aber auch von Enzymen wie der MMP (*matrix metalloproteinase*) (Burdin, Van Kooten et al. 1995, Shu, Kiniwa et al. 1995, Malik, Greenfield et al. 1996, van Kooten and Banchereau 1997).

CD70 (CD27L) ist der Ligand für CD27, ein TNFRSF Rezeptor der hauptsächlich auf unterschiedlichen aktivierten T-Zellen, B-Zellen und auf reifen dendritischen Zellen zu finden ist. Bei Rezeptoraktivierung wird der NF κ B-Signalweg in Gang gesetzt, was unter anderem zur Proliferation führt (Hintzen, Lens et al. 1994, Tesselaar, Xiao et al. 2003, Silence, Dreier et al. 2014).

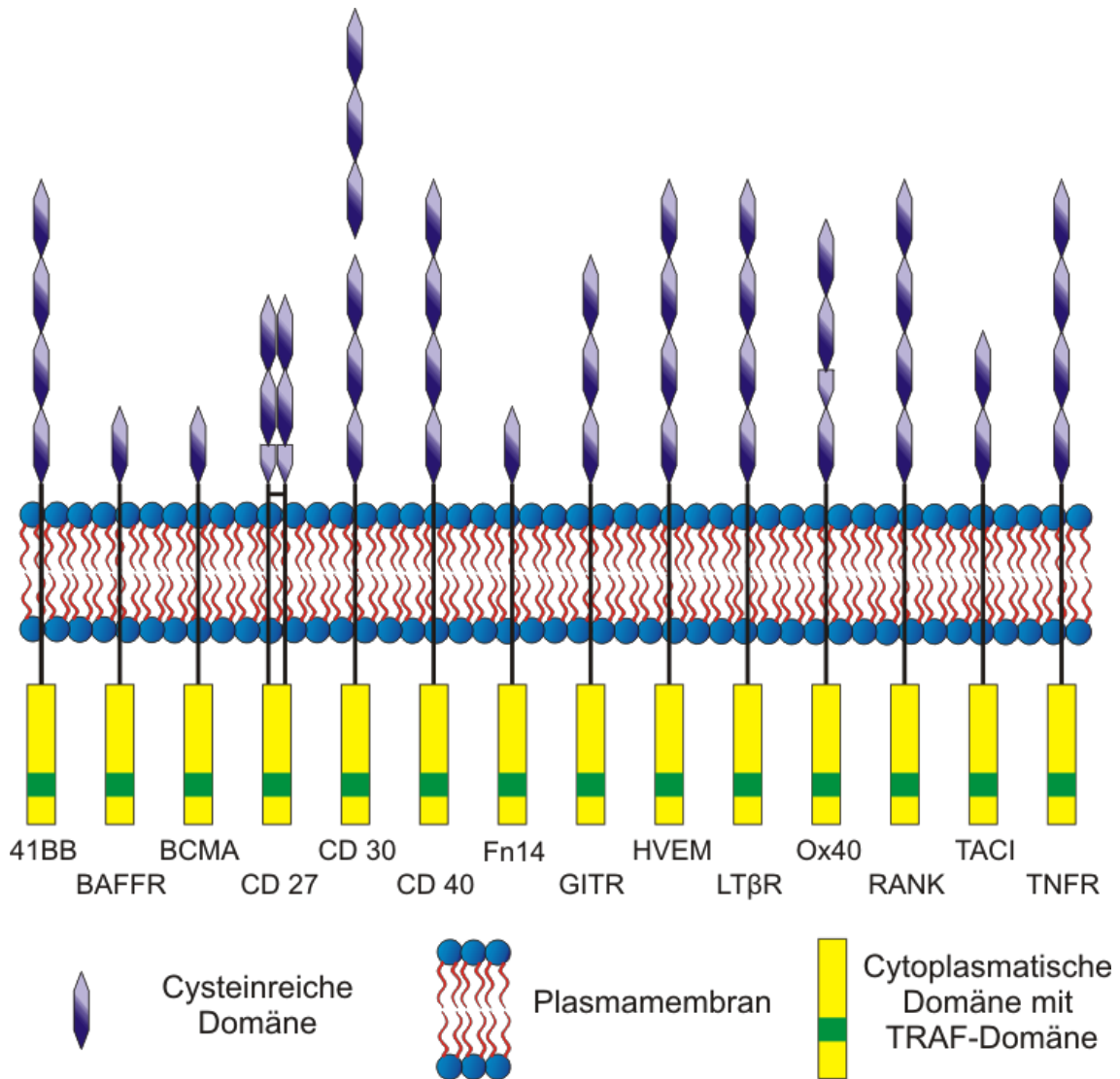


Abbildung 3: Schematische Darstellung der TRAF-interagierenden TNFRSF-Rezeptoren

Abgebildet sind 14 Nicht-Todesrezeptoren. Charakteristisch für die TNFR sind die Cysteinreichen Domänen in Rezeptor abhängiger Anzahl. Im cytoplasmatischen Teil der TRAF-interagierenden TNFRSF-Rezeptoren befindet sich die TRAF-Domäne

1.2.1.3 Decoy-Rezeptoren

Decoy-Rezeptoren sind die dritte Untergruppe der TNFRSF. Sie können in löslicher oder auch membranassoziierter Form vorliegen. Eine weitere Bezeichnung dieser Rezeptoren ist auch Köderrezeptor. Diesen Namen verdanken diese Rezeptoren der Fähigkeit, Liganden der anderen TNFRSF Unterklassen zu binden, allerdings

keine Apoptose oder Signalkaskade zu aktivieren (Cho, Lee et al. 2015). Als Beispiel seien hier DcR1 (*decoy receptor 1*) und DcR2 genannt. Diese sind Zelloberflächen-Rezeptoren, die zwar TRAIL mit hoher Affinität binden, aber nicht in der Lage sind, intrazellulär ein Signal weiterzuleiten, um die Apoptose einzuleiten. DcR1 und DcR2 sind strukturell den Todesrezeptoren TRAILR1 und TRAILR2 sehr ähnlich, allerdings hat DcR1 keinen cytoplasmatischen Anteil. DcR2 besitzt zwar solch einen Abschnitt, die dort befindliche DD ist allerdings inaktiv. Dieser Vorgang dient dem Schutz der Zelle vor ungewollt induzierter Apoptose, ausgelöst von löslichen Liganden der Todesrezeptoren oder membrangebundenen Liganden der Nachbarzellen. Ein Gegenspieler der Fas-induzierten Apoptose ist der DcR3. Dieser wird zum Beispiel in einigen Tumorzellen verstärkt exprimiert (Pan, O'Rourke et al. 1997, Schneider, Bodmer et al. 1997, Sheridan, Marsters et al. 1997, Kumar, Herbert et al. 2005).

1.2.2 Aktivierung von Rezeptoren der TNFR-Superfamilie

Die Rezeptoren der TNFRSF werden natürlicherweise über die Liganden der TNF Superfamilie aktiviert. Die Liganden besitzen C-terminal eine THD Domäne (*TNF homology domain*) (Locksley, Killeen et al. 2001). Diese fördert die Bildung von trimeren Molekülen und ist essentiell für die Bindung an die Rezeptoren (Zhou, Tone et al. 2008). Liganden der TNFSF sind trimere Typ II Transmembranproteine. Die extrazelluläre THD ist dabei durch die sogenannte *stalk-region* vom transmembranen Teil getrennt. Durch proteolytische Spaltung oder auch alternatives Splicing, können TNF Liganden auch in löslicher Form entstehen. Diese beinhalten die THD Domäne und sind so immer noch in der Lage mit TNFRSF Rezeptoren zu interagieren (Locksley, Killeen et al. 2001, Bodmer, Schneider et al. 2002, Wajant 2015).

Jede THD-Domäne eines trimerisierten Liganden interagiert mit je einem Rezeptor. Allerdings hat dieser TNFSF-Ligand₃-TNFRSF-Rezeptor₃-Komplex nur eine sehr geringe Aktivierung des Rezeptor-assoziierten Signalweges zur Folge. Um eine maximale Aktivierung zu erreichen, ist die Bildung eines Komplexes aus zwei oder mehr TNFSF-Ligand₃-TNFRSF-Rezeptor₃-Komplexen notwendig. Dies wird durch

eine Liganden-unabhängige Assemblierung der Rezeptoren durch die PLAD (*pre-ligand assembly domain*) der TNF Rezeptoren ermöglicht (Siegel, Frederiksen et al. 2000, Wajant 2015). Allerdings ist die Affinität der PLAD zueinander sehr gering, so dass die Mehrzahl der Rezeptoren als Monomere und nur sehr wenige als Dimere, oder gar Trimere vorliegen. So können lösliche Liganden nur eine starke Signaltransduktion induzieren, wenn die Rezeptoren eine hohe Eigenaffinität zueinander haben (Cao, Meng et al. 2011).

Die Interaktion zwischen zwei oder mehreren TNFSF-Ligand₃-TNFRSF-Rezeptor₃-Komplexen kann im Falle von löslichen Liganden auch über eine Oligomerisierung der Liganden erreicht werden. Dies kann zum Beispiel über einen Antikörper erzielt werden oder durch gentechnische Fusion mit Protein-Domänen, die einen Zusammenschluss von mehreren Liganden-Trimeren fördern (Wajant 2015).

Im Falle von membranständigen Liganden ist diese sekundäre Oligomerisierung nicht nötig. Sie besitzen durch ihre Verankerung in der Zellmembran eine stark eingeschränkte Mobilität und sind räumlich ausgerichtet und lokal hoch konzentriert. Dadurch fördern sie eine Interaktion bereits gebildeter TNFSF₃-TNFRSF₃-Komplexe. Hierdurch entstehen wie bei oligomerisierten löslichen Liganden supramolekulare Signalkomplexe, die wiederum den Effekt einer starken Signaltransduktion nach sich ziehen (Abb. 4) (Grell, Wajant et al. 1998, Kums 2017).

Passend hierzu konnte gezeigt werden, dass lösliche Liganden, die sekundär an eine Zellmembran gebunden werden, die gleiche Aktivität wie ein membranständiger Ligand aufweisen (Wajant 2015).

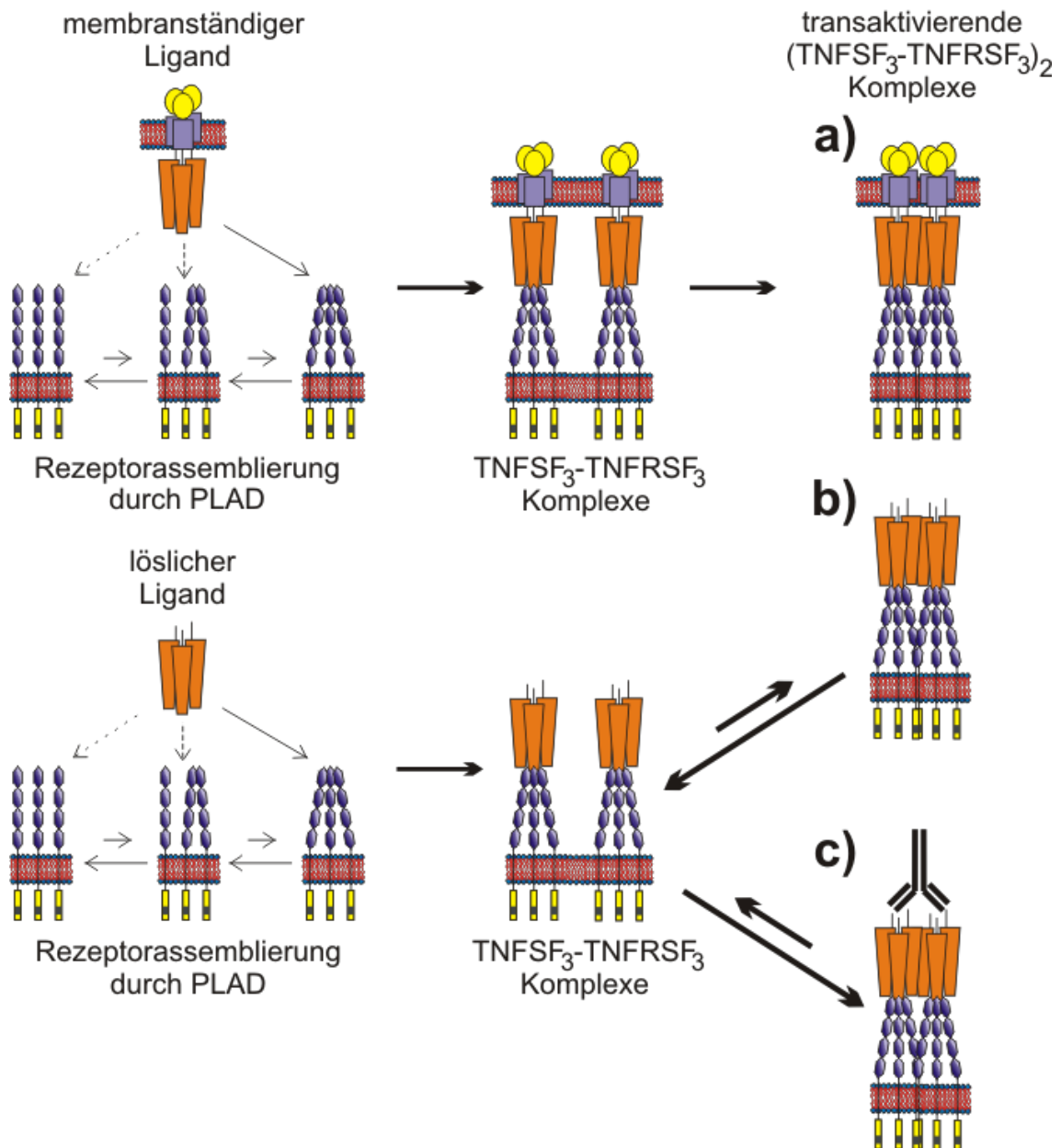


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Aktivierung von Rezeptoren der TNFR-Superfamilie durch deren Liganden

Dargestellt ist die schematische Aktivierung von Rezeptoren der TNFR-Superfamilie durch deren Liganden. Dabei können sich die transaktivierenden Liganden-Rezeptor-Komplexe zum einen durch eine membranassoziierte Immobilisierung der Liganden bilden **(a)**. Zum anderen können sich im Falle von löslichen Liganden solche transaktivierende Liganden-Rezeptor-Komplexe nur spontan durch die Eigenaffinität der Rezeptoren bilden **(b)**, oder über eine sekundäre Oligomerisierung der löslichen Liganden, beispielsweise über Liganden-spezifische Antikörper **(c)**.

Viele der heute zugelassenen Antikörper für die medikamentöse Therapie, aber auch Antikörper für klinische Studien, sind gegen Rezeptoren der TNFRSF gerichtet (Aggarwal, Gupta et al. 2012). Sie haben den großen Vorteil, dass sie eine höhere Halbwertszeit im Serum haben im Vergleich mit den natürlichen Liganden, die nur eine Halbwertszeit von 10-30 Minuten aufweisen (Wajant 2015). Antikörper verhalten sich hierbei wie lösliche Liganden der TNFRSF. Es ist also auch bei den Antikörpern notwendig, diese sekundär zu oligomerisieren, um mehrere Antikörper-Rezeptor₂-Komplexe zu verbinden (Abb. 5a). Dadurch entstehen wiederum supramolekulare Antikörper-Rezeptor-Komplexe, die eine starke Signaltransduktion nach sich ziehen. *In vitro* kann das zum Beispiel über Protein G erreicht werden (Abb. 5b) (Engelmann, Holtmann et al. 1990). Den gleichen Effekt haben IgG3 Antikörper, da sie von Natur aus zur Aggregation neigen (Dhein, Daniel et al. 1992).

In vivo findet die Bildung von transaktivierenden supramolekularen Antikörper-Rezeptor-Komplexen auf andere Weise statt. Vergleichbar mit den TNFSF Liganden, die sekundär an eine Zellmembran gebunden sind, können IgG Antikörper über ihre Fc-Region an die Fcγ-Rezeptoren von beispielsweise B-Zellen binden. Studien haben gezeigt, dass ein IgG Molekül nur mit einem Fcγ-Rezeptormolekül interagiert (Sondermann, Huber et al. 2000, Radaev, Motyka et al. 2001). Es wird vermutet, dass - in Analogie zu membranständigen Liganden - die räumliche Mobilitätseinschränkung von FcγR-gebundenen Antikörpern und deren hohe lokale Konzentration die Eigenaffinität der TNFRSF-Rezeptoren zueinander unterstützt (Abb. 5c) (Wajant 2015).

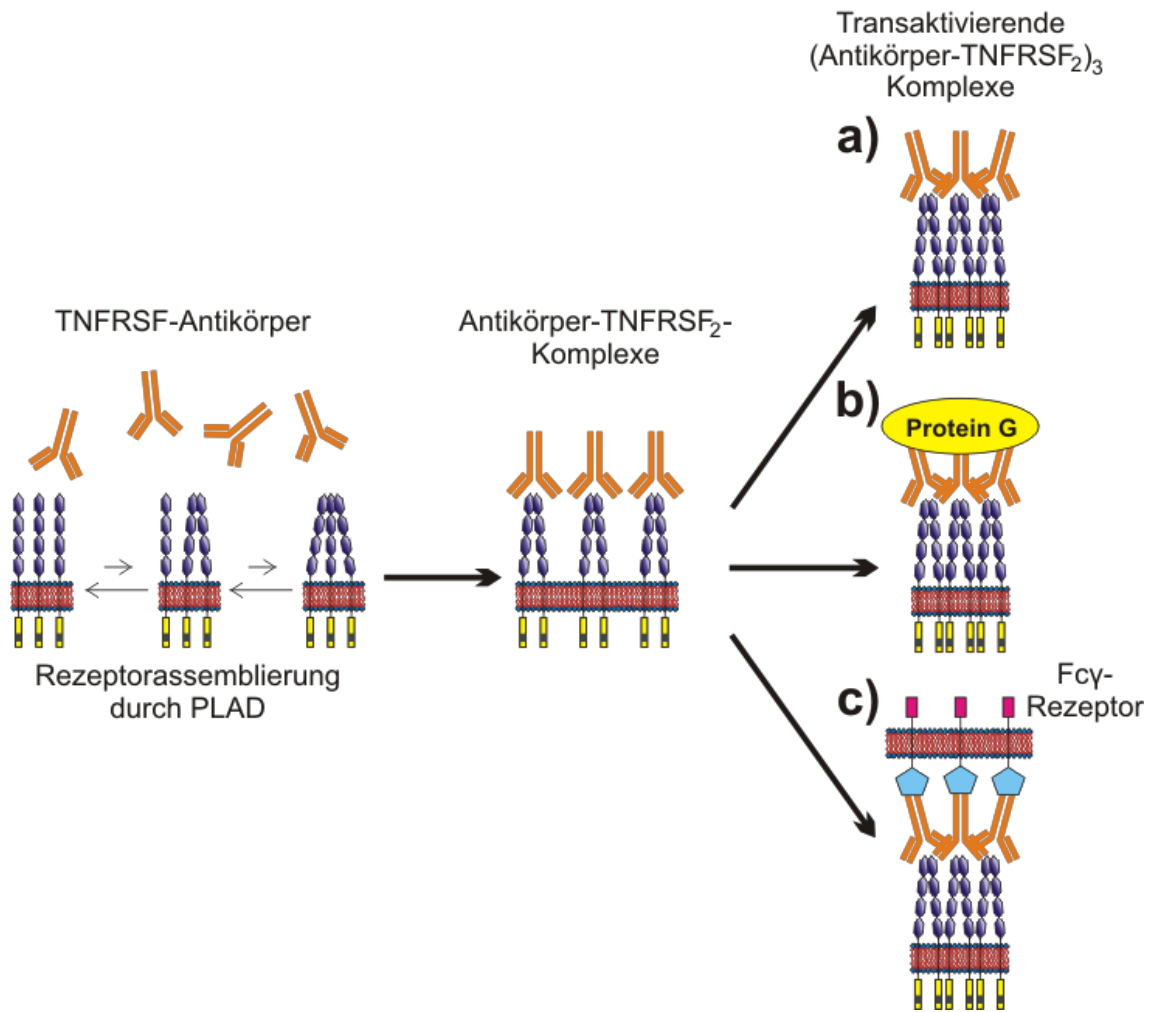


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Aktivierung von Rezeptoren der TNFRSF durch spezifische Antikörper

Dargestellt ist die schematische Aktivierung von Rezeptoren der TNFR-Superfamilie durch TNFRSF-spezifische Antikörper. Transaktivierende Antikörper-Rezeptor-Komplexe bilden sich entweder spontan durch die Eigenaffinität der Rezeptoren (a), durch eine sekundäre Oligomerisierung der TNFRSF-spezifischen Antikörper, zum Beispiel mit Protein G, (b) oder durch eine Rezeptor vermittelte, membranassoziierte Immobilisierung (c)

1.3 Der Transkriptionsfaktor NFκB

Transkriptionsfaktoren sind eine Klasse von Proteinen, die Einfluss auf das Ablesen eines Genabschnittes nehmen. Dieser wird dann als RNA-Molekül vervielfältigt. Dieser Vorgang wird auch Transkription genannt. Dabei können

Transkriptionsfaktoren die Transkriptionshäufigkeit sowohl positiv als auch negativ beeinflussen (Geiger 2017).

Die Transkriptionsfaktoren der NFκB-Familie (*nuclear factor ,kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) spielen eine wichtige Rolle in der Kontrolle der Immunantwort und dabei sowohl beim angeborenen als auch beim erworbenen Immunsystem. Weiterhin kontrollieren diese Faktoren die Entzündungsreaktion und wirken anti-apoptotisch. Sie kommen dabei in einer Vielzahl von Zellen vor. Die NFκB-Proteine befinden sich im Zellinneren und sind im inaktiven Zustand von inhibitorischen Proteinen gebunden. Diese werden IκBs (*inhibitor of nuclear factor ,kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) genannt (Jacobs and Harrison 1998, Hayden and Ghosh 2008). Der NFκB-Signalweg besteht aus der Phosphorylierung und dem anschließendem Verdau dieser IκBs durch Proteasen. Dies ermöglicht wiederum den NFκB-Proteinen in den Nukleus zu gelangen und dort an ihre entsprechenden DNA Abschnitte zu binden und deren Transkription zu regulieren (Baeuerle and Henkel 1994, Ghosh, May et al. 1998, Karin and Ben-Neriah 2000, Li and Verma 2002, Li and Lin 2008).

NFκB bezeichnet ein Dimer aus Proteinen, die zu der Rel Familie gehören, wie p65(RelA), RelB, p50, p52 und c-Rel. Charakteristisch hierbei ist die circa 300 Aminosäuren lange RHR (*Rel homology region*). Die Strukturanalyse von p50 und p65 hat gezeigt, dass jede aus zwei Immunglobulin-ähnlichen Domänen besteht (Ghosh, van Duyne et al. 1995, Muller, Rey et al. 1995). Dabei ist das C-terminale Ende (RHR-c) für die Dimerisierung mit anderen Proteinen der Rel-Familie verantwortlich. Durch unterschiedliche Kombinationen von Homo- und Heterodimeren entstehen unterschiedliche DNA-Bindungsspezifitäten. Die Bindung an die DNA erfolgt über beide Domänen, allerdings stammen sequenzspezifische Interaktionen hauptsächlich von Schleifen der N-terminalen Domäne (Jacobs and Harrison 1998).

Die Aktivierung des NFκB-Signalweges kann durch viele verschiedene Stimuli ausgelöst werden. Dazu gehören zum einen proinflammatorische Zytokine wie TNFα (*Tumor Nekrose Faktor alpha*) oder IL-1 (*Interleucin 1*), aber auch virale

Proteine, bakterielles LPS (*Lipopolysaccharid*), doppelsträngige RNA, sowie Stressfaktoren durch physikalische oder chemische Belastung (Siebenlist, Franzoso et al. 1994, Karin and Ben-Neriah 2000).

Der NFκB-Signalweg kann, sowie auch in dieser Arbeit, als *read out* dienen, zum Beispiel durch Nachweis der IL-8 Produktion mittels ELISA, da die Aktivierung des NFκB-Signalweges zur IL-8 Produktion führt.

Die Entstehung von aktiven NFκB-Dimeren kann aus zwei verschiedenen Signalwegen resultieren: Dem klassischen und dem alternativen Signalweg. (Bonizzi and Karin 2004).

1.3.1 Der klassische NFκB-Signalweg

Der klassische NFκB-Signalweg kann über fast alle Rezeptoren der TNFRSF, aber auch über äußere Einflüsse wie zum Beispiel UV-Licht in Gang gesetzt werden (Kums 2017).

Die Aktivierung der NFκB-Proteindimere erfolgt hierbei über die Phosphorylierung und anschließende proteasomale Degradation der IκB-Proteine mithilfe des IKK (*IκB kinase*)-Komplexes. Dadurch können die NFκB-Dimere, die zuvor in inaktiver Form - durch die Bindung der sogenannten Ankyrin-Repeat-Domäne der IκB-Proteine an die NLS (*nuclear localization signal*) der NFκB-Proteine - vorlagen, in den Zellkern eindringen und dort an ihre spezifischen DNA-Sequenzen binden. Nach erfolgter Rezeptoraktivierung bindet der IKK-Komplex, bestehend aus IKKα, IKKβ und NEMO (*NFκB essential modulator*) an eben jenen Rezeptor und wird durch eine Phosphorylierung aktiviert (Chen, Cao et al. 2002). Für diesen Vorgang wird das Adapterprotein TRAF2 der TRAF Familie benötigt. Es liegt als Homotrimer im Komplex mit cIAP1 (*inhibitor of apoptosis*) oder cIAP2 vor. Diese übertragen ein Ubiquitin auf NEMO, wodurch die für die Phosphorylierung von IKK benötigten Bindestellen für TAB1 (*TAK1-binding-protein*), TAB2 und TAK1 (*TGFβ-activated kinase 1*) entstehen (Abb. 6). Die Notwendigkeit von zwei cIAP1 oder zwei cIAP2 Molekülen für die Übertragung von Ubiquitin, verdeutlicht, dass für die Aktivierung des klassischen NFκB-Signalweges, mindestens zwei trimere

TNF Rezeptor-Komplexe interagieren müssen (Fusco, Savinova et al. 2008, Hayden and Ghosh 2008, Kumar, Makonchuk et al. 2009, Oeckinghaus, Hayden et al. 2011, Hayden and Ghosh 2012, Kums 2017).

1.3.2 Der alternative NFκB-Signalweg

Der alternative NFκB-Signalweg kann, anders als der klassische, nur durch einige Rezeptoren der TNFRSF in Gang gesetzt werden. Die Aktivierung des alternativen NFκB-Signalwegs erfolgt dabei nicht wie beim klassischen Weg über eine Phosphorylierung von IκB-Proteinen, sondern über eine Prozessierung des p100-Proteins in die p52 NFκB-Untereinheit. Das p100-Protein verhält sich dabei ähnlich den IκB-Proteinen, da sie C-terminal ebenfalls die Ankyrin-Repeat-Domäne besitzen und so die NLS des mit ihm im Dimer verbundenen NFκB-Proteins blockieren (Solan, Miyoshi et al. 2002). Dadurch wird wiederum ein Transport dieser NFκB-Proteine in den Zellkern und somit auch die Bindung an ihren DNA-Abschnitt verhindert. Durch die Prozessierung zum p52-Protein wird die Ankyrin-Repeat-Domäne degradiert. Eine Gemeinsamkeit zum klassischen NFκB-Aktivierungsweg ist die Beteiligung von IKK1, welches in aktiver Form in der Lage ist, p100 zu phosphorylieren, wodurch dieses dann ubiquitinyliert werden kann. Durch diesen Vorgang wird eine Degradation zu p52 ermöglicht. Um IKK1 in den aktiven Zustand zu versetzen, ist eine Phosphorylierung notwendig. Dies geschieht mithilfe der NIK (*NFκB-inducing kinase*). Diese liegt in unstimulierten Zellen in ubiquitinylierter, und somit inaktiver, Form vor. Hierfür ist wiederum der TRAF2-cIAP1/2 Komplex verantwortlich. Durch dessen Bindung an die Rezeptoren bei Rezeptoraktivierung, liegt NIK nicht mehr in ubiquitinylierter Form vor und kann somit den Signalweg in Gang setzen (Abb. 6) (Fusco, Savinova et al. 2008, Sun 2011, Hayden and Ghosh 2012, Kums 2017).

Anders als beim klassischen Aktivierungsweg ist hierbei kein Zusammenschluss mehrerer Rezeptoren nötig, da hierbei TRAF2-cIAP1/2 nur an den Rezeptor gebunden werden muss, um seine inhibierende Wirkung auf NIK zu verlieren (Fusco, Savinova et al. 2008).

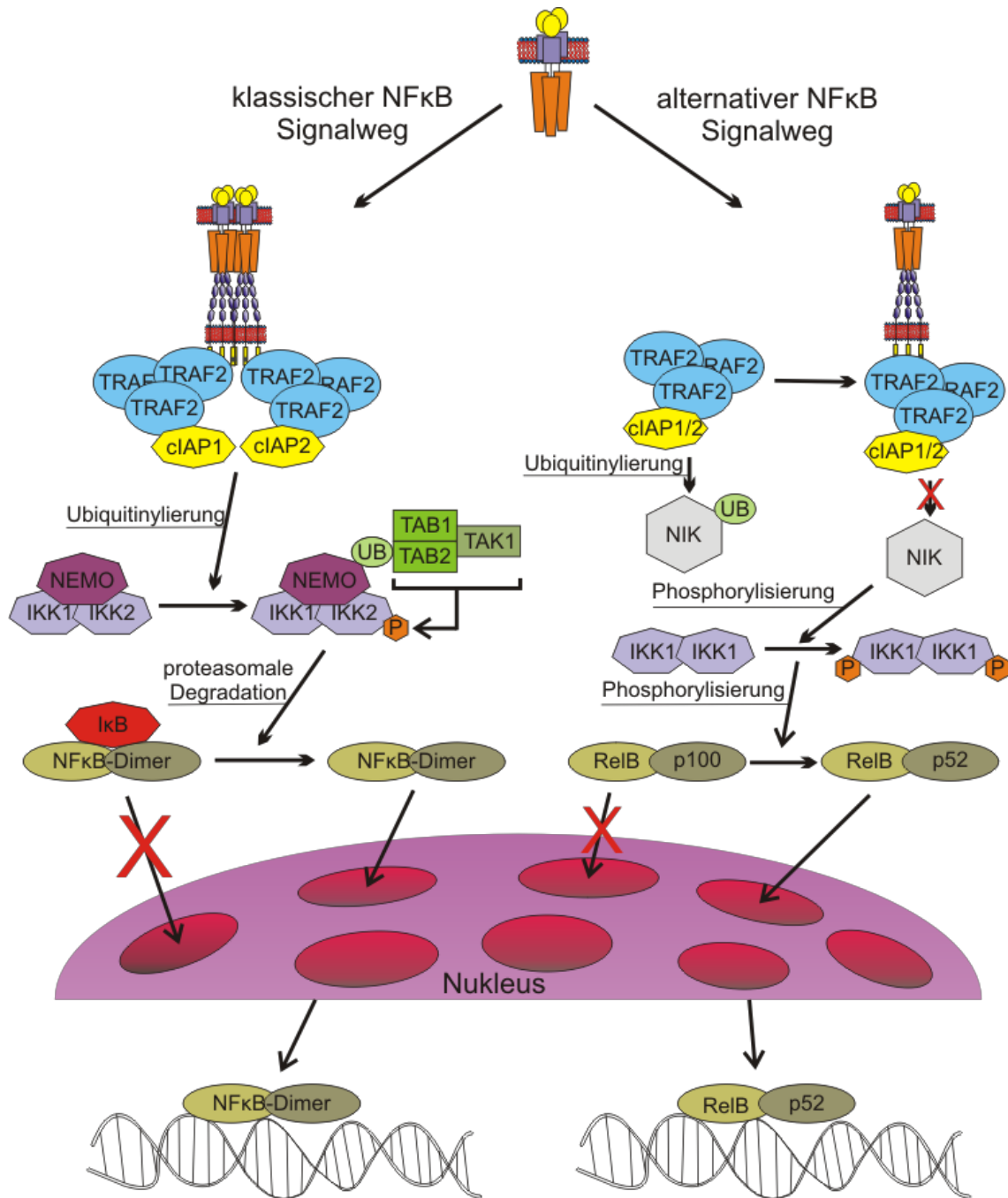


Abbildung 6: Klassischer und alternativer NFκB-Signalweg

Abgebildet ist der schematische intrazelluläre Ablauf des klassischen und alternativen NFκB-Signalweges. Während beim klassischen Weg die Ubiquitinylierung des IKK Komplexes die zentrale Rolle einnimmt, ist das zentrale Ereignis des alternativen Weges die Prozessierung von p100 zu p52 mithilfe der IKK1. Die wichtigsten Unterschiede zwischen den beiden Signalwegen ist zum einen die unterschiedliche Rolle des TRAF2-cIAP1/2-Komplexes, der im klassischen Weg als Aktivator, im alternativen jedoch als Inhibitor fungiert, zum anderen die Tatsache, dass für den alternativen Signalweg keine transaktivierende Liganden-Rezeptor-Komplexe notwendig sind, im Gegensatz zum klassischen Signalweg.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Da anti-TNFRSF-Rezeptor-Antikörper sich bezüglich ihrer Rezeptor-aktivierenden Eigenschaften wie lösliche TNFSF-Liganden verhalten, ist durch die einfache Bindung der Antikörper an die Rezeptoren keine Bildung eines transaktivierenden Antikörper-Rezeptor-Komplexes zu erwarten. Durch den im konstanten Teil der schweren Kette enthaltenen Fc-Teil des Antikörpers, kann eben jener an Fc γ -Rezeptoren binden und sich so wie ein membranständiger Ligand verhalten. Das heißt die durch Fc γ R-Bindung bedingte Immobilisierung und räumliche Ausrichtung des Antikörpers - und damit der Bindungsstellen für die Rezeptoren der TNFRSF - unterstützt nach der heutigen Theorie die Eigenaffinität der TNFRSF Rezeptoren zueinander und erlaubt so die Bildung oligomerer Rezeptorkomplexe, die stark signalisieren.

Ziel dieser Arbeit war es zu überprüfen, ob durch die Fusion eines anti-TNFRSF-Rezeptor-Antikörpers mit einer Verankerungsdomäne, die aus einem gegen ein weiteres zellständiges Zielmolekül gerichteten Antikörperfragments besteht, der aktivierende Effekt der Fc γ R-Bindung mimikriert werden kann. Hierzu wurde exemplarisch ein CD70-bindendes scFv als Verankerungsdomäne verwendet. Weiterhin wurde untersucht, an welcher Antikörperposition das Fragment den höchsten Effekt hervorruft und ob mehrere Fragmente den Effekt positiv oder negativ beeinflussen.

2. Materialien

2.1 Chemikalien, Reagenzien und Zellkulturmedien

1 kb 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)
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)
Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis	GE Healthcare, Garching (GER)
Methanol	Sigma-Aldrich, Schnelldorf (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)
zVAD-fmk	Bachem, Heidelberg (GER)
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen (GER)

2.2 Enzyme

Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP)	Fermentas, St. Leon-Rot (GER)
Restriktionsendonukleasen (Klonierungen)	Fermentas, St. Leon-Rot (GER)
T4-Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot (GER)
Hot Start DNA Polymerase	EMD Millipore Corp., Billerica (USA)

2.3 Antikörper

Anti-FLAG (M2)	Maus IgG1, monoklonal	Sigma-Aldrich, Schnellendorf (GER)
Anti-Mouse 800	Maus IgG1, polyklonal	LI-COR, Lincoln (USA)
Anti-CD70-FITC	Maus IgG1	BD Biosciences, Heidelberg (GER)

2.4 Kommerzielle Kits

BioLux Gaussia Luciferase Assay Kit	New England Biolabs, Frankfurt (GER)
DNA-Gelextraktion NucleoSpin® Extract II Kit	Machery-Nagel, Düren (GER)
DuoSet Mouse CXCL8/IL-8	R&D Systems, Abingdon (UK)
KOD Hot Start DNA Polymerase	Merck Millipore, Darmstadt (GER)
OptEIA IL-8-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

Autoklavierbeutel	Hartenstein, Würzburg (GER)
CO ₂ -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)
ELISA Plates (96-well; high binding)	Greiner, Frickenhausen (GER)
Eppendorf-Pipetten:	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)
Glaspipetten	Brand, Wertheim (GER)
Glaspasteurpipetten	Brand, Wertheim (GER)
Handzähler	neoLab, Heidelberg (GER)
Heizblock	PeqLab, Erlangen (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-well 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)
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)
Wägeschälchen	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)

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 % β -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 ₂ O
LB Medium (5-fach konzentriert)	10 g/l Pepton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l Natriumchlorid
PBS (Phosphate buffered saline)	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 (Tris buffered saline)	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	Institutseigener Vorrat	Fibrosarkomzellen
Jurkat	Institutseigener Vorrat	T-Lymphozyten
BJAB	Institutseigener Vorrat	B-Lymphozyten
Daudi	Institutseigener Vorrat	B-Lymphozyten
Ramos	Institutseigener Vorrat	B-Lymphozyten
Raji	Institutseigener Vorrat	B-Lymphozyten

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

3. Methoden

3.1 Klonierung der schweren und leichten AK-Ketten

Für die AK-Expression wurde der pCR3- Expressionsvektor (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet, der sowohl eine Ampicillin-Resistenz zur Selektion als auch einen FLAG-Tag zur späteren Aufreinigung der Konstrukte kodiert. Zunächst wurde der parentale Vektor mit Restriktionsenzymen verdaut. Hierfür wurde der Ansatz aus Plasmid und Enzymen für 90 Minuten in einem Wasserbad auf 37 Grad Celsius erwärmt, wobei dem Ansatz während der letzten 30 Minuten eine alkalische Phosphatase (CIAP) hinzugefügt wurde, um die freien DNA-Enden zu dephosphorylieren.

Auf gleiche Art und Weise wurde der Insertvektor mit den gleichen Restriktionsenzymen verdaut, um das Insert zu erhalten. Allerdings wurde diesem Ansatz keine alkalische Phosphatase hinzugefügt. In manchen Fällen wurde das benötigte Insert über die Polymerasekettenreaktion (PCR) mit entsprechenden Primern vervielfältigt und dann mit den gleichen Restriktionsenzymen wie der dazugehörige Vektor verdaut.

Der Verdau von Vektor und Insert wurde anschließend per Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die gewünschten DNA-Fragmente ausgeschnitten. Die im Gel enthaltene DNA wurde mit dem DNA-Gelextraktions Kit „NucleoSpin Extract II“ aufgereinigt. Um den Vektor und das Insert miteinander zu ligieren, wurde möglichst eine gleiche Menge beider DNA Fragmente mit einer T4 Ligase zusammengebracht. Dieser Ansatz wurde per Hitzeschock in kompetente *Escherichia coli* Bakterien eingebracht und diese dann auf einem Agar-Nährboden mit 0,1% Ampicillin verteilt. Einzelne Bakterienklone wurden entnommen und die DNA extrahiert. Per Probeverdau wurde kontrolliert, ob die Klone das neu klonierte Plasmid mit dem DNA-Fragment enthalten. Anschließend wurden positive Klone in 150ml LB-Medium über Nacht in einem Brutschrank gezüchtet

und nach Extraktion und Reinigung der Plasmid-DNA (PureYield™ Plasmid Midiprep System) deren Sequenz überprüft (GATC Biotech).

3.2 Zellkultur

Die verwendeten Zellen wurden in einer Lösung aus RPMI 1640 Medium mit 10 % FBS (Fetal Bovine Serum) bei 37° Celsius und 5 % CO₂-Anteil in einem Brutschrank kultiviert. Um die Zellen zu expandieren, wurde bei den Suspensionszellen circa 80 % des Mediums mit enthaltenen Zellen entnommen und die in der Flasche verbliebenen restlichen Zellen wurden zur weiteren Kultivierung mit frischem Medium versetzt. Um adhärenente Zellen zu lösen, wurde eine Lösung aus PBS und Trypsin/EDTA verwendet. Die abgelösten Zellen wurden mit frischem Medium resuspendiert und im Verhältnis 1:5 (HEK293 Zellen) beziehungsweise 1:10 (HT1080 und HT1080-CD40 Zellen) gesplittet. Die übrigen Zellen wurden dann für 4 Minuten bei 1200 rpm (adhärenente Zellen) bzw. 800 rpm (Suspensionszellen) zentrifugiert und für Versuche mit frischem RPMI 1640 Medium mit 10 % FBS und zusätzlich 1 % Penicillin/Streptomycin versetzt oder für spätere Zwecke kryokonserviert. Hierzu wurden die Zellen in FBS mit 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid) überführt und bei -80 °C gelagert.

3.3 Produktion der Antikörper

Zur Produktion der Antikörper bzw. der Antikörper-Fusionsproteine wurden HEK293 Zellen verwendet. Dazu wurde zuerst ein Transfektionsansatz, bestehend aus jeweils 6 µg Plasmid-DNA der schweren und der leichten Kette zusammen mit 36 µg PEI-Reagenz, in 2ml RPMI 1640 Medium mit 1 % Penicillin/Streptomycin angesetzt. Dieser wurde 10-15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit erfolgte bei den auf 15 cm Zellkulturschalen ausplattierten HEK293 Zellen ein Mediumwechsel von RPMI 1640 Medium mit 10% FBS auf RPMI 1640 Medium mit 1% Penicillin/Streptomycin ohne FBS. Der Transfektionsansatz wurde dann tropfenweise hinzugegeben und die Zellen über Nacht in einem Brutschrank bei 37° Celsius und 5 % CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel auf 1640 RPMI Medium mit 2 % FBS und 1 %

Penicillin/Streptomycin. Die transfizierten Zellen wurden in diesem Medium für 5-7 Tage kultiviert. Dann wurde der Überstand abgenommen, 10 Minuten bei 4600 rpm zentrifugiert und in ein 50 ml Falcon Röhrchen überführt. Der Überstand wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4° Celsius gelagert.

3.4 Anti-FLAG-Affinitätschromatographie

Einige der Antikörper bzw. Antikörper-Fusionsproteine wurden mittels anti-FLAG-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Hierzu wurden M2-Agarosebeads verwendet. Diese wurden zunächst mit TBS in einer Tropfsäule gewaschen. Anschließend wurden die Überstände auf die Säule mit den Beads gegeben und über Nacht mit einer Tropfgeschwindigkeit von 1 Tropfen pro 20 bis 25 Sekunden in den Kühlraum gestellt. Am nächsten Tag wurden die Beads mit TBS gewaschen. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte durch die Zugabe von 100 µg/ml FLAG-Peptid in TBS (4x Säulenvolumen). Die Tropfgeschwindigkeit wurde für die Elution auf 2 bis 3 Tropfen pro Minute eingestellt. Die Antikörper wurden in Fraktionen zu je 700 µl gesammelt. Die M2-Agarosebeads wurden nach der Elution ein weiteres Mal mit TBS gewaschen und zur Wiederverwendung bei -20 °C gelagert (50 % Glycerol in TBS, 0,02 % Natriumazid). Die Eluate wurden über Nacht mithilfe eines Dialyseschlauches gegen PBS dialysiert und dann steril filtriert und mittels Western Blot und Silbergel-Färbung die Konzentration der ALKs im Eluat bestimmt. Die gereinigten Proteine wurden kurzfristig bei 4 °C bzw. zur langfristigen Lagerung bei -20 °C aufbewahrt.

3.5 Western Blot

Die Bestimmung der Konzentration des Antikörpers im Überstand oder in aufgereinigter Form wurde mittels Western Blot abgeschätzt. Dazu wurde zunächst ein SDS-Polyacrylamid-Gel (SDS-PAGE), bestehend aus einem 12 %-igen Trenngel und einem Sammelgel, gegossen. Für das Trenngel wurden Trenngelpuffer und 12 % Acrylamid verwendet, zur Polymerisation wurden dann 0,1 % TEMED und 0,1 % APS hinzugegeben. Um einen glatten Übergang zum Sammelgel zu erreichen, wurde das Trenngel vor der Polymerisation mit einer

dünnen Schicht (1 ml) Isopropanol bedeckt. Diese wurde nach der Erstarrung des Gels wieder entfernt. Anschließend wurde das Sammelgel aufgetragen, zusammengesetzt aus Sammelgelpuffer, Acrylamid, 0,1 % APS und 0,1 % TEMED. Zur besseren Unterscheidung der verschiedenen Gele wurde das Sammelgel mit Bromphenolblau eingefärbt. Zusätzlich wurde ein Kamm eingesetzt, um die Probenaschen zu erhalten.

Die Antikörperproben sowie bereits vorab definierte Standardproben, wurden mit β -Mercaptoethanol-enthaltendem Proteinladepuffer angesetzt und bei 95° Celsius für 5 Minuten denaturiert. Nach der Auspolymerisation des SDS-Polyacrylamid-Gels wurde der Kamm entfernt und die Taschen mit den Proteinproben und einem Molekulargewichts-Marker beladen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 90 V für ca. 15 Minuten und weitere 90 Minuten bei 120 V. Die im SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennten Proteine wurden dann mittels Elektrotransfer in einem Tank-Blotkammer-System auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Hierzu wurde die Membran in Blotpuffer getränkt und auf das Gel aufgelegt. Diese wurden nun zusammen so in die Blotkammer eingebracht, dass die Nitrozellulosemembran zu Anode zeigt und das SDS-PAGE-Gel zur Kathode. Zum Transfer wurde eine Stromstärke von 400 mA für 150 Minuten genutzt. Die Membran wurde entnommen und für eine Stunde bei Raumtemperatur in 5 % PBST-Milch auf einem Schüttler geschwenkt, um eine unspezifische Bindung des Primärantikörpers zu verhindern und anschließend 3 mal für 10 Minuten mit PBST gewaschen. Die Membran wurde nun über Nacht bei 4° Celsius mit dem Primärantikörper anti-FLAG (M2) auf einem Schüttler inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran wiederum 3 mal für 10 Minuten mit PBST gewaschen und für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem HRP-konjugierten (horseradish peroxidase) Sekundärantikörper inkubiert. Es folgten weitere drei Waschschrte mit PBST für 10 Minuten.

3.6 Silberfärbung

Zur genaueren Konzentrationsbestimmung der gereinigten Proteine wurde eine Silberfärbung vorgenommen. Hierzu wurde zunächst, wie in Abschnitt 3.5

beschrieben, ein SDS-Polyacrylamid-Gel (SDS-PAGE) hergestellt. Allerdings wurde im Gegensatz zu dem SDS-PAGE für ein Western Blot dem Sammelgel kein Bromphenolblau hinzugefügt. 1 µl der aufgereinigten Protein-Eluate wurde mit 5 µl β-Mercaptoethanol-enthaltendem Proteinladepuffer gemischt und bei 95° Celsius für 5 Minuten denaturiert. Anschließend wurde das SDS-Polyacrylamid-Gel mit den verschiedenen Eluaten sowie mit einem Proteinmarker und einem Silbergelmarker beladen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 120 V für ca. 105 Minuten. Es folgte die Benetzung des Gels bei Raumtemperatur mit den Reagenzien des Silver Stain Kits (Fermentas GmbH, St.Leon-Rot). Hierzu wurde das Gel zunächst zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen und anschließend zweimal mit einer Fixierlösung (bestehend aus destilliertem Wasser, 30 % Ethanol und 10 % Essigsäure) benetzt. Es folgten zwei weitere Waschgänge mit einer fallenden Alkoholreihe, das heißt zuerst mit destilliertem und autoklaviertem Wasser mit 10 % Ethanol und anschließend mit purem destilliertem Wasser. Nun wurde das Gel 1 min mit einer Sensitizer Working Solution (25 ml destilliertem Wasser mit 50 µl Sensitizer) behandelt und folgend erneut mit autoklaviertem und destilliertem Wasser für 5 Minuten gewaschen. Die anschließende Behandlung des Gels mit der Stain Working Solution (500 µl Enhancer in 25 ml Silver Stain) dauerte 30 Minuten. Vor der Zugabe der Developer Working Solution (25 ml Stain Developer mit 500 µl Enhancer) wurde das Gel wiederum zweimal für 20 Sekunden mit autoklaviertem destilliertem Wasser gewaschen. Die Developer Working Solution verblieb so lange auf dem Gel, bis die Banden des Silbergelmarkers die gewünschte Intensität aufwiesen. Um die weitere Reaktion zu stoppen wurde eine 5 % Essiglösung hinzugegeben. Das Gel wurde in destilliertem Wasser bis zur Auswertung und Dokumentation aufbewahrt.

3.7 IL-8 Elisa

Zur Bestimmung der IL-8-Konzentration in Zellkulturüberständen AK- bzw. AK-Fusionsprotein behandelter Zellen wurden zunächst über Nacht in einer 96-Well Platte HT1080 - beziehungsweise HT1080-CD40 - Zellen in RPMI-Medium mit 10 % FBS und 1 % Penicillin/Streptomycin in einer Konzentration von 2×10^4

Zellen ausgesät. Am nächsten Tag wurden in einer separaten 96-Well-Platte eine Verdünnungsreihe mit den Antikörpern in RPMI-Medium mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin in Triplikaten vorgelegt. Zu diesem Ansatz wurden die Ko-Kulturzellen hinzugegeben (6×10^4 Suspensionszellen bzw. 3×10^4 adhärenente Zellen). Anschließend wurde diese Platte für 30 Minuten im Brutschrank vorinkubiert. Bei HT1080 Zellen, die mit anti-Fas Antikörper-Varianten inkubiert wurden, wurde zunächst das Medium abgesaugt und neues RPMI-Medium mit 10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin, 7,5 µl/ml CHX-Lösung, versetzt mit 60 µM des Caspase-Inhibitors Z-VAD-FMK hinzugegeben. Letzteres verhindert die durch den Fas-Antikörper induzierte Apoptose der Zellen. Dieser Ansatz wurde ebenfalls für 30 Minuten im Inkubator vorinkubiert. Danach wurde das Medium dieser Platte abgesaugt und die Verdünnungsreihe mit den Ko-Kulturzellen auf die adhärenente Zellen übertragen. Bei den HT1080 Zellen wurde das Medium mit CHX und zVAD nicht abgesaugt, sondern die Verdünnungsreihe unter Berücksichtigung des zusätzlichen Verdünnungsfaktors hinzugegeben. Die Platten wurden über Nacht inkubiert und am nächsten Tag wurde die Konzentration an IL-8, das in den Zellkulturüberstand sezerniert wurde, mit Hilfe des „OptEIA Human IL-8 ELISA Kits“ (BD OptEIA) bzw des „DuoSet Human CXCL8/IL-8 Kits“ (R&D Systems) bestimmt.

3.8 Zytotoxizitätsassay

Zur Vitalitätsbestimmung von HT1080 Zellen in Ko-Kultur nach Stimulation mit anti-Fas-Konstrukten, wurden 2×10^4 Zellen pro well in 96-well Platten ausgesät und über Nacht in RPMI 1640 Medium mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert. Am nächsten Morgen wurde in einer neuen 96-well Platte eine Verdünnungsreihe der Antikörper angesetzt und diese mit 6×10^4 Ko-Kultur-Suspensionszellen versetzt. Bei den HT1080 Zellen erfolgte ein Mediumwechsel auf frisches Medium mit 7,5 µg/ml CHX. Beides wurde eine halbe Stunde im Brutschrank vorinkubiert. Die Verdünnungsreihe mit den Ko-Kulturzellen wurde auf die HT1080 Zellen übertragen. Zur Kontrolle wurde sowohl ein 100 % Lebend-Wert mit reinem RPMI 1640 Medium mit 10 % FCS und

1 % Penicillin/Streptomycin angelegt, sowie ein 0 % Lebend-Wert mit einem Toxizitätsmix aus 200 ng/ml FasL-Fc, 200 ng/ml TRAIL-TNC, 200 ng/ml TNF-F und 2,5 µg/ml CHX. Die HT1080 Zellen wurden jetzt für circa 20 Stunden stimuliert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und 70 µl Kristallviolett-Lösung für 20 min bei Raumtemperatur hinzugegeben. Zum Entfernen der überschüssigen Kristallviolett-Lösung wurden die Platten einmal in destilliertem Wasser gewaschen, vorsichtig ausgeklopft und über Nacht zum Trocknen stehen gelassen. Nun wurden die Platten mithilfe des „ELISA-Reader Lucy 2“ bei 595 nm analysiert.

3.9 Durchflusszytometrie

Zur Kontrolle der Expression des Oberflächenrezeptors CD70 auf verschiedenen Zellen wurde die Durchflusszytometrie angewendet. Hierfür wurden 10^7 Zellen der zu überprüfenden Zelllinie mit einem PE-konjugierten anti-CD70 Antikörper behandelt sowie mit der dazugehörigen Isotypkontrolle. Dann wurden die Zellen für 30 Minuten bei 4° Celsius inkubiert und danach 2 mal mit PBS gewaschen. Abschließend wurden die zellgebundenen Antikörper per Durchflusszytometrie detektiert.

4. Ergebnisse

4.1 Klonierung der neuen Antikörper und Antikörper-Fusionsproteine

Als erster Schritt wurden die Expressionsplasmide kloniert, die für die gewünschten anti-CD40- und anti-Fas-Antikörper-Fusionsproteine kodieren. Für beide Antikörper wurden jeweils die schweren Ketten für ein Fab₂-Konstrukt, den hIgG1-Isotyp und die hIgG1-N297A Mutante kloniert. Die Fab₂-Variante und die N297A-Mutante zeigen dabei keine oder eine reduzierte FcγR-Bindung. Als Modifizierung wurde jeder dieser schweren Ketten am C-Terminus ein scFv-Fragment, bestehend aus den beiden variablen Domänen eines CD70 bindenden Antikörpers, hinzugefügt. Für die Expressionsplasmide der leichten Ketten wurden im Rahmen dieser Arbeit unter anderem Konstrukte angefertigt, die für die entsprechende leichte Kette des anti-CD40- beziehungsweise anti-Fas-Antikörpers kodieren und zusätzlich als Modifikation am C-terminalen konstanten Ende ebenfalls eine CD70-spezifische scFv-Domäne aufweisen. Zusätzlich wurden in dieser Arbeit bereits in der Arbeitsgruppe vorhandene Plasmide verwendet, die für die parentale leichte Kette und die parentale schwere Kette kodieren, sowie für das parentale Fab₂-Konstrukt. Außerdem wurden Plasmide verwendet, die für die leichte Kette des Antikörpers mit angehängter *Gaussia princeps* *Luziferase* (GpL) kodieren. Dies erlaubte die Produktion von Antikörper-GpL-Varianten, die für eventuelle zelluläre Bindungsstudien genutzt werden können.

In der folgenden Tabelle 1 sind sowohl sämtliche klonierten Plasmide aufgelistet, sowie die dafür verwendeten Vektor- und Insertplasmide als auch die zur Klonierung eingesetzten Restriktionsenzyme. Bei einigen Konstrukten war ein einfacher Verdau von bereits vorhandenen Inserts nicht möglich, sodass auf eine PCR (*Polymerase chain reaction*) zurückgegriffen werden musste. Die dafür verwendeten Templates und Primer sind ebenfalls in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1: Tabellarische Auflistung der klonierten Plasmide

	Plasmidname	Vektor	Insert	Restriktionsenzyme	Template	Primer
1	α CD40-hIgG1-Fab ₂ -F-HC-scFv:CD70-pCR3	α CD40(hIgG1-Fab ₂)-F-HC-heavy-GpL-pCR3		Xho1 + Xba1 (+CIP bei Vektor)	α CD70(hIgG1)-F-HC-heavy-full-TNC-Gpl-pCR3	α CD70-HC-Xho1-fwd + α CD70-LC-STOP-Xba1-rwd
2	α CD40(hIgG1)-F-HC-heavy-full-scFv:CD70-pCR3	α CD40(hIgG1-Fab ₂)-F-HC-heavy-scFv:CD70-pCR3		Xho1 + Hind3 (+CIP bei Vektor)	α CD40(hIgG1)-F-HC-heavy-full-pCR3	T7 + Fc-HC-Xho1-rwd
3	α CD40(hIgG1-N297A)-F-HC-heavy-full-scFv:CD70-pCR3	α CD40(hIgG1-N297A)-F-HC-heavy-full-scBAFF-pCR3	α Fas(hIgG1-Fab ₂)-F-HC-heavy-scFv:CD70-pCR3	Xho1 + Xba1 (+CIP bei Vektor)		
4	α CD40(hIgG1)-F-LC-light-full-scFv:CD70-pCR3	α CD40(hIgG1)-F-LC-light-full-GpL-pCR3	α Fas(hIgG1-Fab ₂)-F-HC-heavy-scFv:CD70-pCR3	Xho1 + Xba1 (+CIP bei Vektor)		
5	α CD40-hIgG1-F-LC-GpL-pCR3	α Fn14(18D1)-F-LC-light-full-GpL-pCR3		EcoR1 + BamH1 (+CIP bei Vektor)	α CD40(hIgG1)-F-LC-light-full-TNC-GpL-pCR3	α CD40-EcoR1-FP + α CD40-HC-BamH1-rwd
6	α Fas(hIgG1-Fab ₂)-F-HC-heavy-scFv:CD70-pCR3	α Fas(hIgG1-Fab ₂)-F-HC-heavy-GpL-pCR3		Xho1 + Xba1 (+CIP bei Vektor)	α CD70(hIgG1)-F-HC-heavy-full-TNC-Gpl-pCR3	α CD70-HC-Xho1-fwd + α CD70-LC-STOP-Xba1-rwd
7	α Fas(hIgG1)-F-HC-heavy-full-scFv:CD70-pCR3	α Fas(hIgG1)-F-HC-heavy-full-scBAFF-pCR3	α Fas(hIgG1-Fab ₂)-F-HC-heavy-scFv:CD70-pCR3	Xho1 + Xba1 (+CIP bei Vektor)		
8	α Fas-hIgG1(N297A)-F-HC-scFv:CD70-pCR3	α Fas(hIgG1-N297A)-F-HC-heavy-full-scBAFF-pCR3	α Fas(hIgG1-Fab ₂)-F-HC-heavy-scFv:CD70-pCR3	Xho1 + Xba1 (+CIP bei Vektor)		
9	α Fas(hIgG1)-F-LC-light-full-scFv:CD70-pCR3	α Fas(hIgG1)-F-LC-light-full-GpL-pCR3	α Fas(hIgG1-Fab ₂)-F-HC-heavy-scFv:CD70-pCR3	Xho1 + Xba1 (+CIP bei Vektor)		
10	α Fas(hIgG1)-F-HC-heavy-full-pCR3	α Fn14(18D1)-F-HC-heavy-full-pCR3	α Fas(hIgG1)-pMA-T	EcoR1 + BamH1 (+CIP bei Vektor)		

Zusätzlich zu den selbst klonierten Konstrukten wurden bereits in der Arbeitsgruppe vorhandene Plasmide für diese Arbeit verwendet. Diese sind in Tabelle 2 aufgelistet:

Tabelle 2: Auflistung der von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wajant zur Verfügung gestellten Plasmide

Plasmidname	Plasmid #
α CD40-hIgG1-F-LC-pCR3	7/182
α CD40-hIgG1-F-HC-full-pCR3	7/181
α CD40-Fab ₂ -F-pCR3	7/475
α Fas(hIgG1)-Flag-LC-light-full-pCR3	7/289
α Fas(hIgG1)-Flag-LC-light-full-GpL-pCR3	7/290
α Fas(hIgG1-Fab ₂)-Flag-HC-heavy-full-pCR3	7/474

4.2 Produktion

Im Anschluss an die Klonierung der verschiedenen Antikörperketten wurden die Antikörperfusionsproteine mithilfe von HEK293 Zellen produziert. Hierfür wurden die verschiedenen Expressionsplasmid-Paare, die für die diversen AK-Fusionsproteine kodieren, mittels PEI-Transfektion in die HEK293-Zellen eingebracht. Der Überstand wurde nach 7-tägiger Inkubation der Zellen bei 37°Celsius und 5 %-CO₂ abgenommen. Die Konzentration des Antikörpers im Überstand wurde mittels SDS-Page und anschließender Western Blot Detektion mit anti-Flag Antikörpern und einem Flag-Protein-Standard bestimmt (Tab. 3) (Abb. 7).

Tabelle 3: Hek293-Produktivität der Antikörper-Fusionsproteine.

Jedes Antikörper-Fusionsprotein wurde dreimal unabhängig voneinander produziert und anschließend die Konzentration mittels SDS-Page und Western Blot Detektion bestimmt.

Konstruktname	Konz. 1 (µg/ml)	Konz. 2 (µg/ml)	Konz. 3 (µg/ml)	MW (µg/ml)
αCD40-hIgG1-CH:scFv:CD70	28,5	27,6	27	27,7
αCD40-hIgG1(N297A)-CH:scFv:CD70	29,3	38,9	37,4	35,2
αCD40-Fab ₂ -CH:scFv:CD70	18,6	11,7	21,4	17,2
αCD40-Fab ₂ -CH:scFv:CD70-LC:GpL	11,8	11,7	10,8	11,4
αCD40-hIgG1	35,3	35,6	22,4	31,1
αFas-hIgG1-CH:scFv:CD70	40,1	33,7	41,7	38,5
αFas-N297A-CH:scFv:CD70	44,2	45,5	43,7	44,5
αFas-Fab ₂ -CH:scFv:CD70	29	28,7	31,4	29,7
αFas-Fab ₂ -CH:scFv:CD70-CL:GpL	41,6	38,8	41,7	40,7
αFas-hIgG1	33,2	30,7	32,5	32,1
αCD40-Fab ₂ -CL:scFv:CD70	21,9	26,4	31,4	26,6
αCD40-Fab ₂ -CH:scFv:CD70-CL:scFv:CD70	18,8	18,1	18,5	18,5
αFas-Fab ₂ -CL:scFv:CD70	43	42,2	49,6	44,9
αFas-Fab ₂ -CH:scFv:CD70-CL:scFv:CD70	29,1	29,4	30,1	29,5

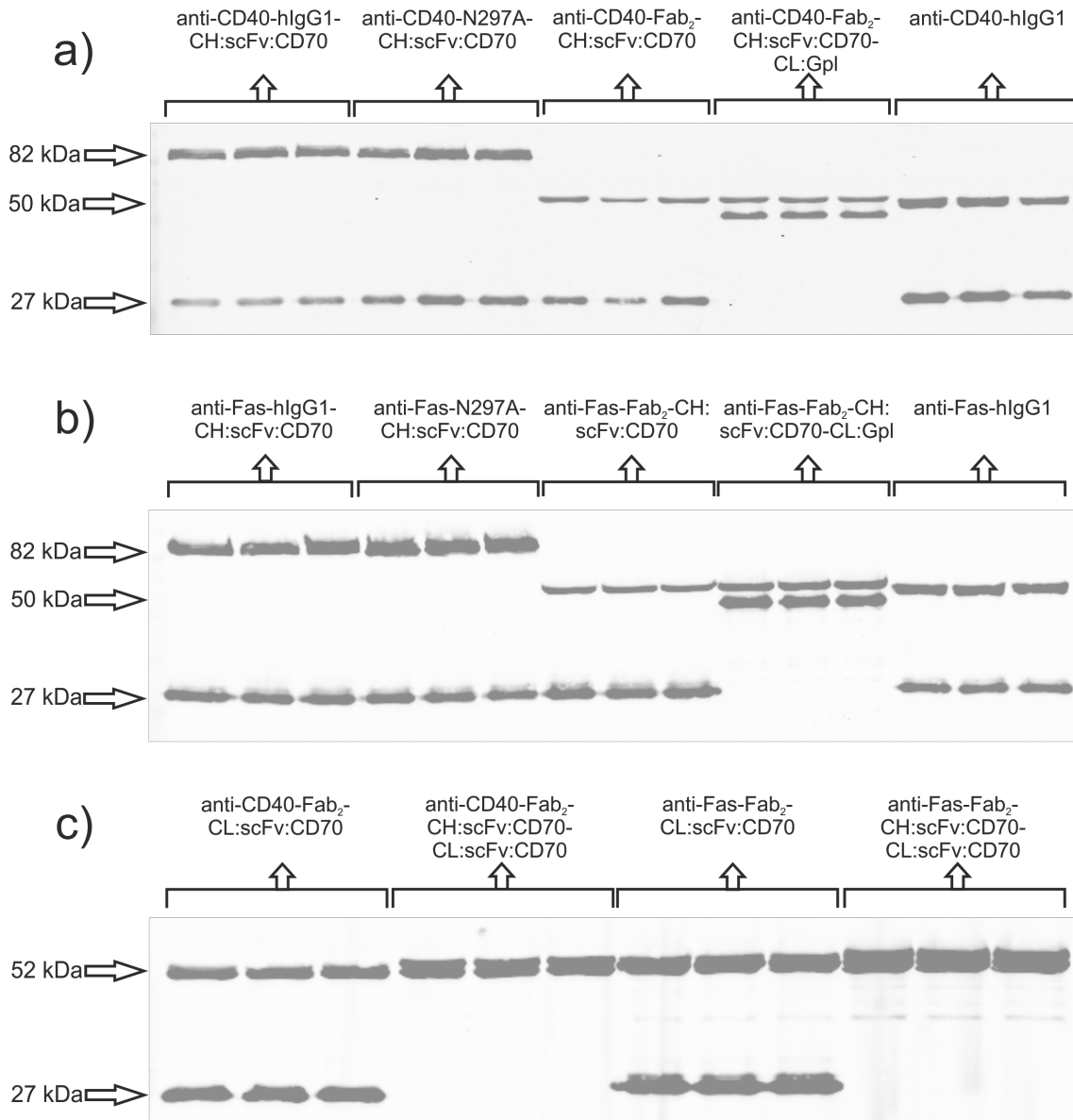


Abbildung 7: Western Blot Analyse der produzierten Antikörper

Mit Hilfe eines SDS-Gels wurden jeweils 10 µl Überstand des angegebenen AK-Fusionsproteins pro Spur aufgetragen. Je Variante wurden jeweils drei voneinander unabhängige Produktionen aufgetragen. Durch das Auftragen eines vorher definierten Proteinstandards konnte die Konzentration bestimmt werden

Die so produzierten Antikörper sind wie in Abbildung 8 dargestellt aufgebaut:

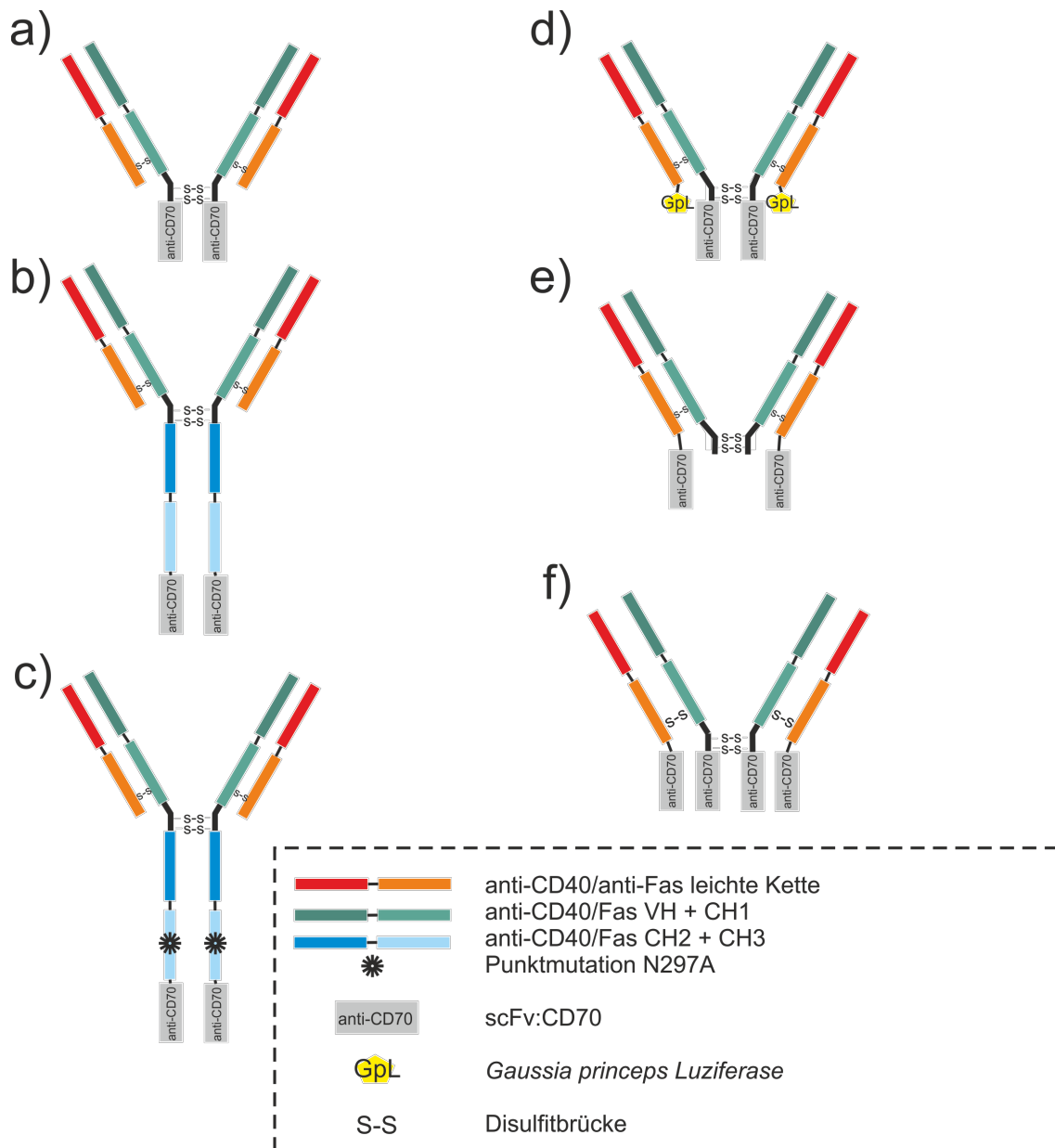


Abbildung 8: Schematischer Aufbau der Produzierten Antikörper

- a) *Fab₂-Konstrukt mit scFv:CD70 an der schweren Kette*
- b) *parentaler hIgG1 Antikörper mit scFv:CD70 an der schweren Kette*
- c) *N297A Mutant mit scFv:CD70 an der schweren Kette*
- d) *Fab₂-Konstrukt mit scFv:CD70 an der schweren und einer Gaussia princeps Luziferase an der leichten Kette*
- e) *Fab₂-Konstrukt mit scFv:CD70 an der leichten Kette*
- f) *Fab₂-Konstrukt mit scFv:CD70 sowohl an der leichten als auch an der schweren Kette*

4.3 Funktionsüberprüfung der ungereinigten Antikörper-Fusionsproteine

4.3.1 Überprüfung der CD70-abhängigen Antikörper-vermittelten Rezeptoraktivierung in HEK293 Ko-Kulturen

Nach der Produktion und Konzentrationsbestimmung der gewünschten Antikörper-Fusionsproteine wurde deren Funktionalität überprüft. Da sowohl die anti-CD40-Antikörper in HT1080-CD40 Zellen als auch die anti-Fas-Antikörper in HT1080 Zellen durch Bindung an ihren jeweiligen Rezeptor (CD40 bzw. Fas) den NF κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*)-Signalweg aktivieren, wurde als Überprüfung der Funktionalität der Proteine ein IL-8-Elisa gewählt. IL-8 kann hierbei als Indikator der NF κ B-Aktivierung verwendet werden, da das IL-8-Gen stark NF κ B-anhängig reguliert wird. Hierzu wurde ein Ko-Kultur Assay durchgeführt, in dem die Antikörper-Fusionsproteine und die CD40- bzw. Fas-responsiblen HT1080-Zellen jeweils mit HEK293 Zellen kokultiviert wurden, die entweder mit CD70 als Bindepartner der Fusionsproteine oder einem Leervektor als Kontrolle transfiziert waren. Erwartet wurde, dass die Antikörper mit den CD70-positiven Ko-Kulturzellen durch Immobilisierung und räumliche Ausrichtung über die scFv:CD70 Domäne eine deutlich höhere agonistische Aktivität aufbringen als mit den Kontrollzellen. Da Fas zu den Todesrezeptoren gehört, mussten die HT1080-Zellen vor der Zugabe der Antikörper-Fusionsproteine mit 2,5 μ g pro ml CHX und 20 μ M zVAD-fmk vorinkubiert werden, um die Zellen zu sensitivieren und eine anti-Fas induzierte Apoptose der HT1080 Zellen zu verhindern.

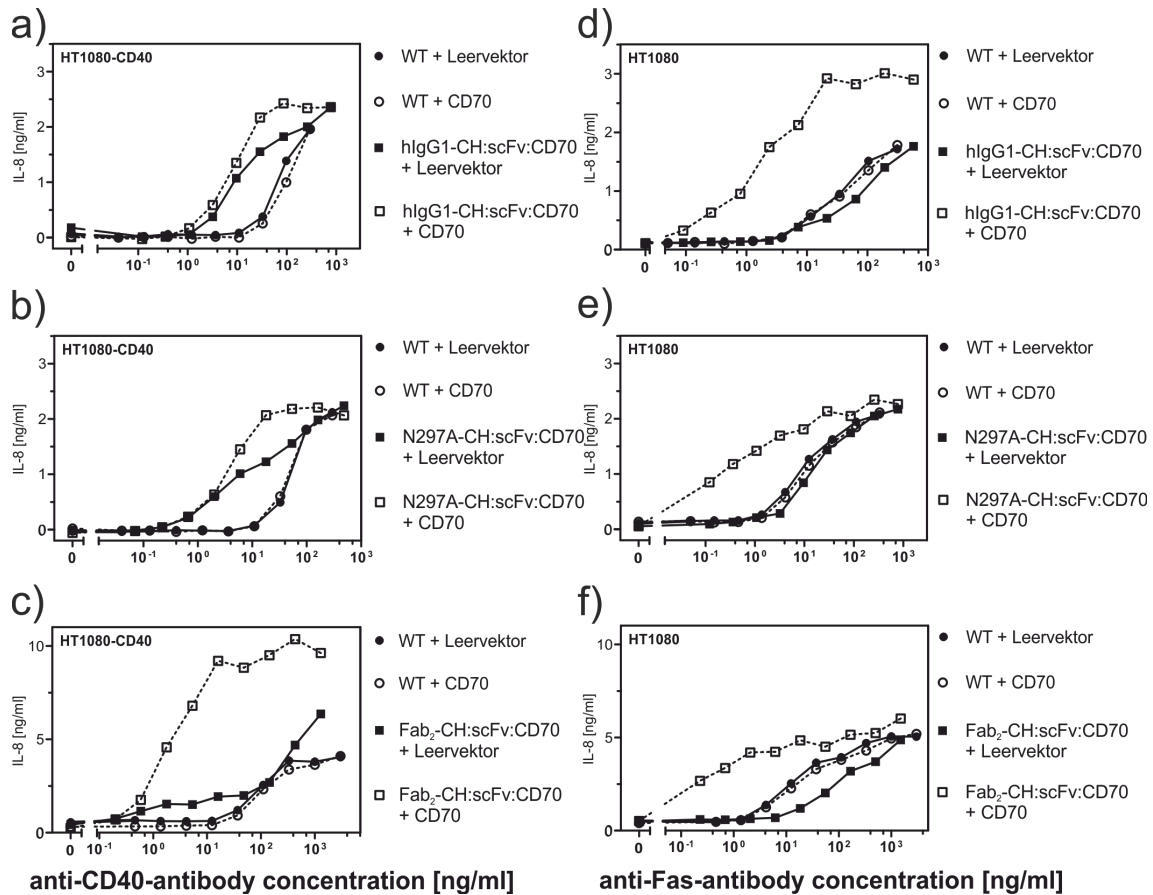


Abbildung 9: Agonistische Aktivität der anti-CD40 (bzw. anti-Fas)-Antikörper-Fusionsproteine auf HT1080-CD40 (bzw. HT1080) Zellen nach Stimulation mit HEK 293 Ko-Kulturellen, in die CD70 bzw. ein Leervektor transfiziert wurde

Die HT1080(-CD40) Zellen wurden über Nacht in 96-Well Platten ausgesät (2×10^4 Zellen pro Well). Um die anti-Fas induzierte Apoptose in den HT1080 Zellen zu verhindern, wurden diese vor Zugabe der Antikörper für 30 Minuten mit zVAD-FMK und CHX vorinkubiert. Am nächsten Tag wurden den Zellen dann die angegebenen Konzentrationen von anti-CD40 bzw. anti-Fas Antikörper-Fusionsproteinen hinzugefügt, die zuvor für 30 Minuten mit 3×10^4 Ko-Kulturzellen (HEK293) pro Well vorinkubiert wurden. Die HEK293 Zellen wurden zuvor mittels PEI entweder mit einem Leervektor oder einem CD70-kodierenden Expressionsvektor transfiziert. Die Platten wurden über Nacht in den Inkubator gestellt. Zum Vergleich wurden neben den Antikörper-Fusionsproteinen auch die parentalen Antikörper unter gleichen Bedingungen getestet. Am nächsten Tag wurde die IL-8-Konzentration im Überstand mittels Elisa gemessen. Jede Konzentration wurde hierfür in Triplikaten gemessen und der Mittelwert gebildet.

In Abbildung 9 ist eine deutliche Aktivitätsdifferenz der HT1080 bzw. HT1080-CD40 Zellen mit den verschiedenen Ko-Kulturzellen zu erkennen. Wie zu erwarten, steigt die IL-8-Konzentration, die hier als Maß für die Aktivierung des jeweiligen Rezeptors steht, bei Zugabe des Antikörperfusionsproteins mit Ko-Kulturzellen, die CD70 auf der Zelloberfläche exprimiert haben, bei deutlich niedrigeren Konzentrationen des Antikörpers, als bei Ko-Kulturzellen, die kein CD70 exprimieren.

Es ist zu erkennen, dass die Antikörper-Fusionsproteine ohne CD70-positive Ko-Kulturzellen eine zu den parentalen Antikörpern vergleichbare schwache Aktivität aufweisen. Ausnahme hierbei sind Abbildung 9 a) und b), wo zu erkennen ist, dass auch bereits anti-CD40-hIgG1-CH:scFv:CD70 und anti-CD40-N297A-CH:scFv:CD70 mit CD70-negativen Ko-Kulturzellen eine gesteigerte IL-8-Produktion im Vergleich zum parentalen Kontrollantikörper aufweisen. Das in CD70-negativen Kokulturen entstehende IL-8-Signal kann durch eine Aggregation der Antikörper-Fusionsproteine im Überstand entstehen. Im Vergleich der beiden Antikörper anti-CD40 und anti-Fas fällt auf, dass die anti-Fas-Fusionsproteine bereits bei niedrigeren Konzentrationen eine Rezeptoraktivierung induzieren als die anti-CD40-Fusionsproteine

Wie von den Daten in Abbildung 9a), b), d) und e) abzulesen, ergibt sich kein nennenswerter Unterschied zwischen den hIgG1 Antikörper-Fusionsproteinen und den N297A Antikörper-Fusionsproteinen. Abbildung 9 c) und f) lassen allerdings erkennen, dass die Fab₂-Konstrukte eine verbesserte CD70-abhängige Aktivität aufweisen. Ebenso deuten insbesondere die in Abb. 9 f) gezeigten Daten darauf hin, dass das Fab₂-Konstrukt ohne kompatible Ko-Kulturzellen einen geringeren Effekt auf die Zielzellen hat, als der parentale Antikörper.

4.3.2 Überprüfung der CD70-abhängigen Antikörper-vermittelten

Rezeptoraktivierung mittels endogen CD70 exprimierender Tumorzelllinien

Da die HEK293 Zellen, die mit einem CD70-Expressionsplasmid transfiziert wurden, eine sehr hohe, möglicherweise nicht physiologische Dichte an CD70-

Antigen auf der Zelloberfläche exprimieren, wurden die Ko-Kulturversuche - im sonst gleichen Aufbau - mit humanen Tumorzelllinien wiederholt, die *per se*, das heißt endogen, CD70 exprimieren. Als CD70-positive Zellen wurde hierbei die B-Zell-Lymphom Zelllinie BJAB verwendet, die CD70-negative T-Zell-Leukämie Zelllinie Jurkat diente als Negativkontrolle.

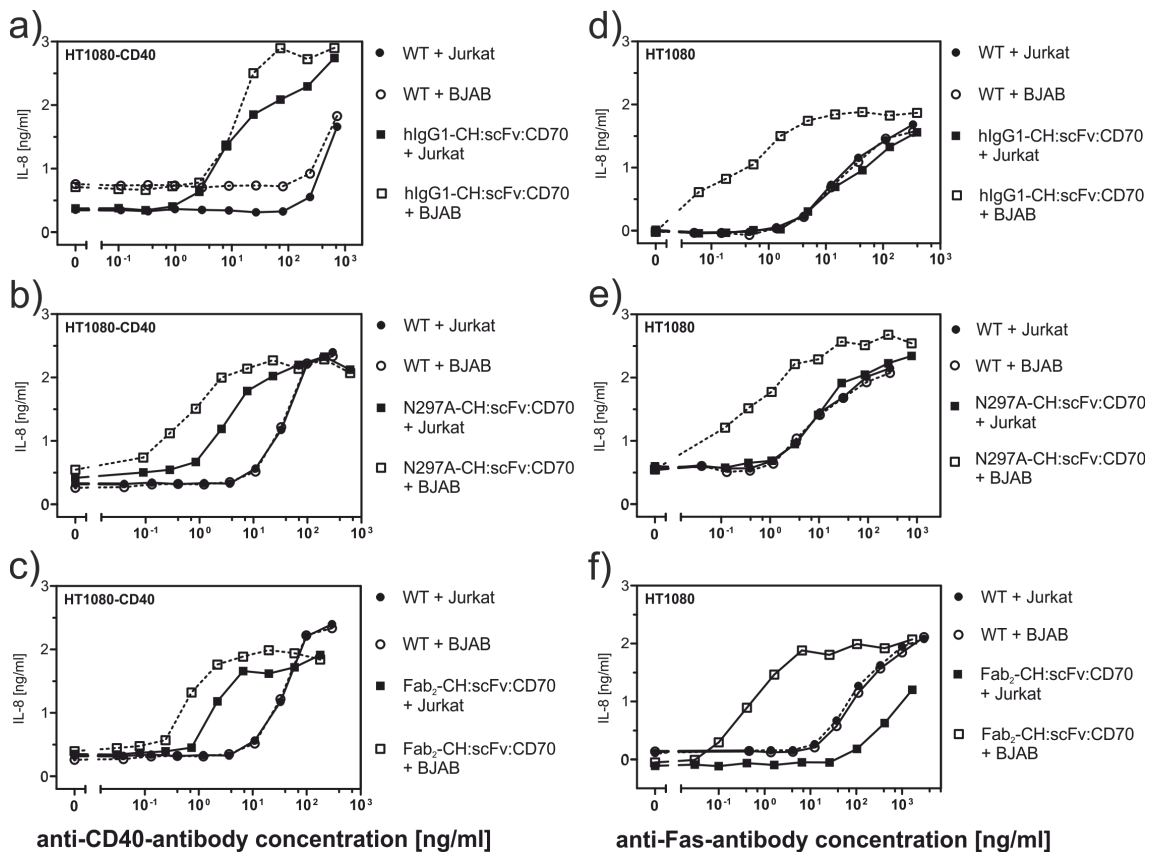


Abbildung 10: Agonistische Aktivität der anti-CD40 (bzw anti-Fas)-Antikörper-Fusionsproteine auf HT1080-CD40 (bzw. HT1080) Zellen nach Stimulation mit CD70-positiven BJAB Zellen und CD70-negativen Jurkat Zellen als Kontrolle

Die HT1080(-CD40) Zellen wurden über Nacht in 96-Well Platten ausgesät (2x10⁴ Zellen pro Well). Um die anti-Fas induzierte Apoptose in den HT1080 Zellen zu verhindern, wurden diese vor Zugabe der Antikörper für 30 Minuten mit zVAD-FMK und CHX vorinkubiert. Am nächsten Tag wurden den Zellen dann die angegebenen Konzentrationen von anti-CD40 bzw. anti-Fas Antikörper-Fusionsproteinen hinzugefügt, die zuvor für 30 Minuten mit 6x10⁴ Ko-Kulturzellen (BJAB beziehungsweise Jurkat) pro Well vorinkubiert wurden. Die Platten wurden über Nacht in den Inkubator gestellt. Zum Vergleich wurden neben den Antikörper-Fusionsproteinen auch die parentalen Antikörper unter gleichen Bedingungen getestet. Am nächsten Tag wurde die

IL-8-Konzentration im Überstand mittels Elisa gemessen. Jede Konzentration wurde hierfür in Triplikaten gemessen und der Mittelwert gebildet.

Es zeigt sich mit BJAB-Zellen ein ähnliches Bild wie zuvor mit CD70-Transfektanten. Wenn BJAB als Ko-Kulturzellen verwendet wurden, ist eine deutlich geringere Konzentration an Antikörpern nötig, um den NFκB-Weg zu aktivieren, als bei den Jurkat Zellen, die kein CD70 exprimieren (Abb. 10).

Wiederum ist in den Daten in Abbildung 10 a) und b), sowie entsprechend d) und e), kein nennenswerter Unterschied zwischen dem hIgG1 und dem N297A Antikörper-Fusionsprotein zu erkennen, während das Fab₂-Konstrukt einen deutlich besseren Effekt erzielt, wie in f) abzulesen. Ebenso bestätigt sich hier die Beobachtung aus Abschnitt 4.3.1, dass das Fab₂-Konstrukt ohne entsprechende Ko-Kulturzellen bei gleicher Konzentration einen geringen Effekt erzielt, als der parentale Antikörper.

4.3.3 CD70-abhängige anti-Fas-Antikörper-vermittelten Rezeptoraktivierung

Da anti-Fas über den Todesrezeptor Fas (auch CD95, APO1 genannt) die Apoptose auslösen kann, wurden zur weiteren Überprüfung der Funktionalität der anti-Fas-Antikörper-Fusionsproteine Zytotoxizitätsexperimente durchgeführt. Hierzu wurden zum einen wiederum mit CD70-Expressionsplasmid und mit Kontrollplasmid transfizierte HEK293-Zellen und zum anderen CD70-positive BJAB- und CD70-negative Jurkat-Zellen als Ko-Kulturzellen für Fas-sensitive HT1080-Zellen verwendet. Die ausplattierten HT1080-Zellen wurden mit 2,5 µg pro ml CHX vorinkubiert.

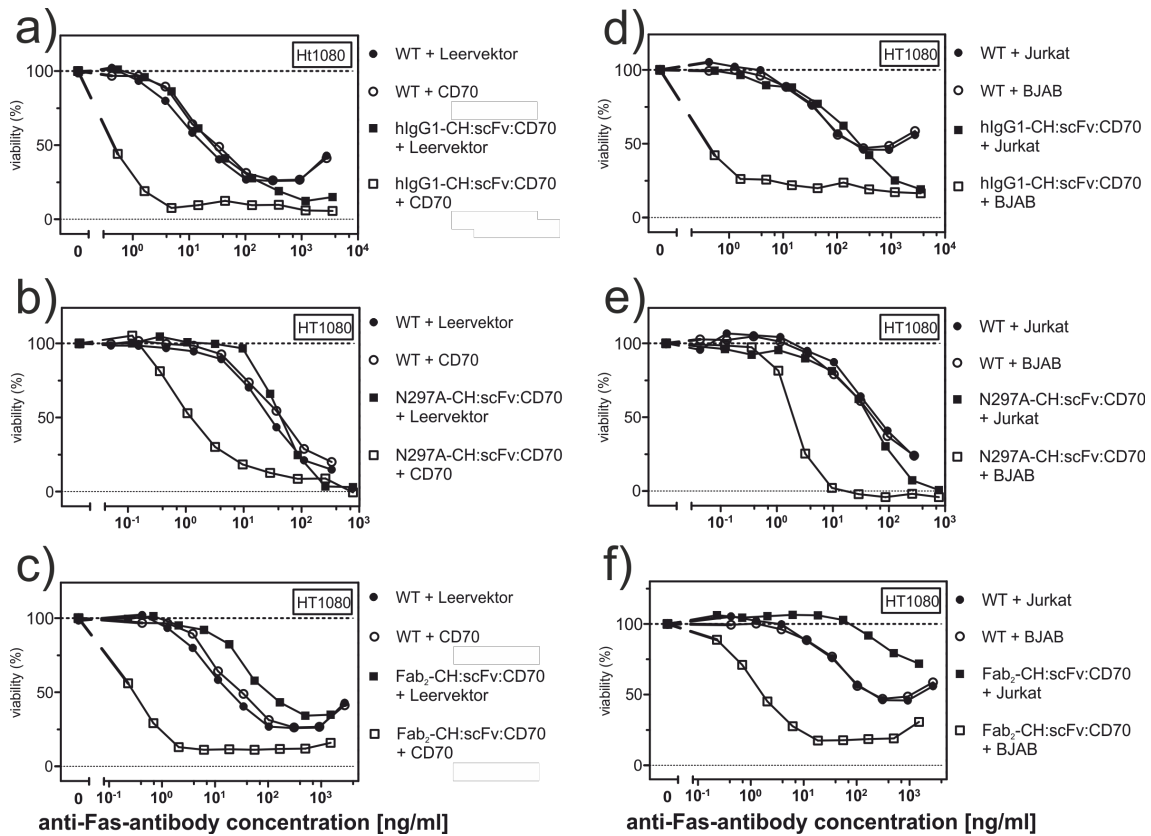


Abbildung 11: Agonistische Aktivität der anti-CD40 (bzw anti-Fas)-Antikörper-Fusionsproteine auf HT1080-CD40 (bzw. HT1080) Zellen nach Stimulation mit Ko-Kulturzellen

HT1080 Zellen wurden in 96-Well Platten ausgesät (20000 pro Well) und über Nacht kultiviert. Vor der Zugabe der Antikörper wurden die HT1080 Zellen mit $2,5\mu\text{g pro ml}$ CHX vorinkubiert. Am nächsten Tag wurden den Zellen dann die angegebenen Konzentrationen von anti-Fas Antikörper-Fusionsproteinen hinzugefügt, die zuvor für 30 Minuten mit 3×10^4 (HEK293) bzw. 6×10^4 (Jurkat und BJAB) Ko-Kulturzellen pro Well vorinkubiert wurden. Den HEK293 Zellen wurde einmal ein Leervektor und einmal ein CD70 Rezeptor mittels PEI transfiziert. Die Platten wurden nun über Nacht in den Inkubator gestellt. Zum Vergleich wurde neben den Antikörper-Fusionsproteinen der parentale CD40-Antikörper unter gleichen Bedingungen getestet. Am nächsten Tag wurde die Vitalität der HT1080 Zellen über eine Kristallviolett-färbung bestimmt. Jede Konzentration wurde hierfür in Triplikaten gemessen und der Mittelwert gebildet.

Auch in diesem Assay zeigt sich eine deutliche Aktivitätsdifferenz der Antikörper-Fusionsproteine zwischen den mit CD70-positiven und CD70-negativen Zellen durchgeführten Ko-Kultur-Experimenten. Weiterhin bestätigt sich die

Beobachtung, dass beim hIgG1 und N297A Antikörper-Fusionsprotein mit CD70 negativen Zellen, die gleiche Aktivität zu beobachten ist, wie beim parentalen Antikörper. Die Ausnahme ist wiederum das Fab₂-Konstrukt, das sogar eine geringere CD70-unabhängige Aktivität aufweist (siehe Abbildung 11).

Um zu überprüfen, ob die Zellen durch induzierte Apoptose oder Nekroptose gestorben sind, wurde ein weiterer Versuchsansatz durchgeführt. Hierzu wurden die Hälfte der ausplattierten HT1080 Zellen vor Zugabe des Antikörpers mit zVAD-FMK vorinkubiert, um eine durch anti-Fas induzierte Apoptose zu verhindern (Abb. 12).

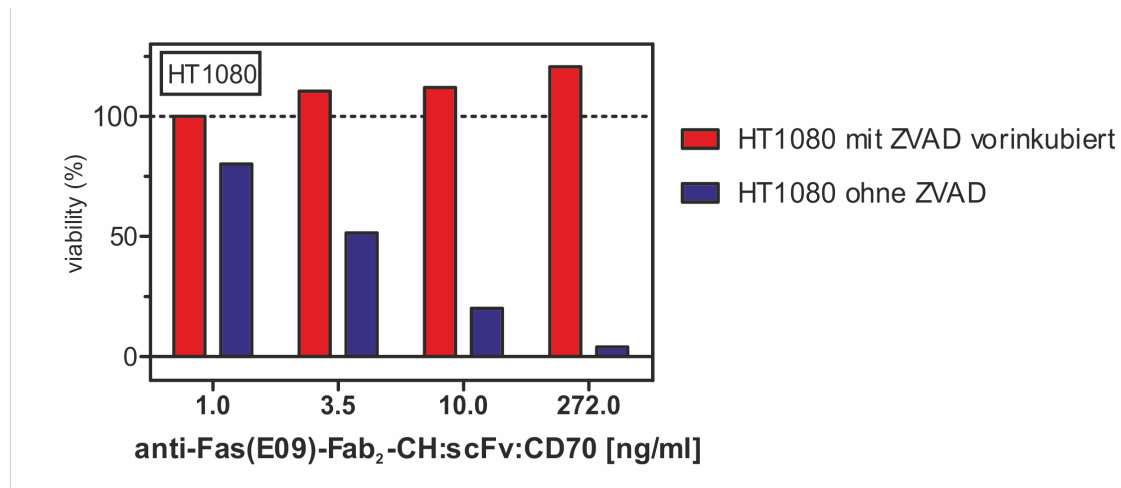


Abbildung 12: Vitalitätsbestimmung von HT1080 Zellen nach Inkubation mit und ohne zVAD

Die HT1080 Zellen wurden wie in Abbildung 11 ausgesät. Anschließend wurde die Hälfte der Zellen für 30 Minuten mit zVAD-FMK vorinkubiert. Folgend wurden die angegebenen Konzentrationen von anti-Fas-Fab₂-CH:scFv:CD70 hinzugegeben, die zuvor mit 6×10^4 Ko-Kulturzellen (BJAB) pro Well vorinkubiert wurden. Am nächsten Tag wurde die Vitalität der HT1080 Zellen über eine Kristallviolett-färbung bestimmt. Jede Konzentration wurde hierfür in Triplikaten gemessen und der Mittelwert gebildet.

Am Beispiel des Antikörper-Fusionsproteins anti-Fas-Fab₂-CH:scFv:CD70 wurde weiterhin gezeigt, dass HT1080 Zellen, die mit zVAD-FMK vorinkubiert wurden, auch bei hohen Konzentrationen des Konstruktes keinen Vitalitätsverlust

vorweisen. Dies zeigt, dass die HT1080 tatsächlich durch anti-Fas-Fab₂-CH:scFv:CD70 induzierte Apoptose verstarben.

4.3.4 Vergleich von Antikörper-Fusionsproteinen mit scFv:CD70 in unterschiedlicher Anzahl und an verschiedenen Positionen

Da bisher gezeigt werden konnte, dass Antikörper mit einer scFv:CD70 Anchoring-Domäne in Kombination mit CD70-positiven Ko-Kulturzellen in den Zielzellen CD70-abhängig eine höhere agonistische Aktivität hervorrufen, wurde als nächster Schritt überprüft, ob die Platzierung der scFv:CD70 einen Einfluss auf die Aktivierung hat, beziehungsweise an welcher Stelle der Effekt am stärksten zum Tragen kommt und ob dieser durch Steigerung der Anzahl der scFv:CD70 Anchoring-Domänen im Konstrukt erhöht werden kann.

Hierzu wurde exemplarisch anti-Fas-Fab₂-Varianten mit scFv:CD70 Anchoring-Domänen an der schweren Kette, an der leichten Kette oder an beiden Ketten in Zytotoxizitätsexperimenten simultan untersucht. Der Fab₂-Antikörper wurde gewählt, da er in den vorgehenden Experimenten den stärksten CD70-abhängigen Aktivierungseffekt aufwies.

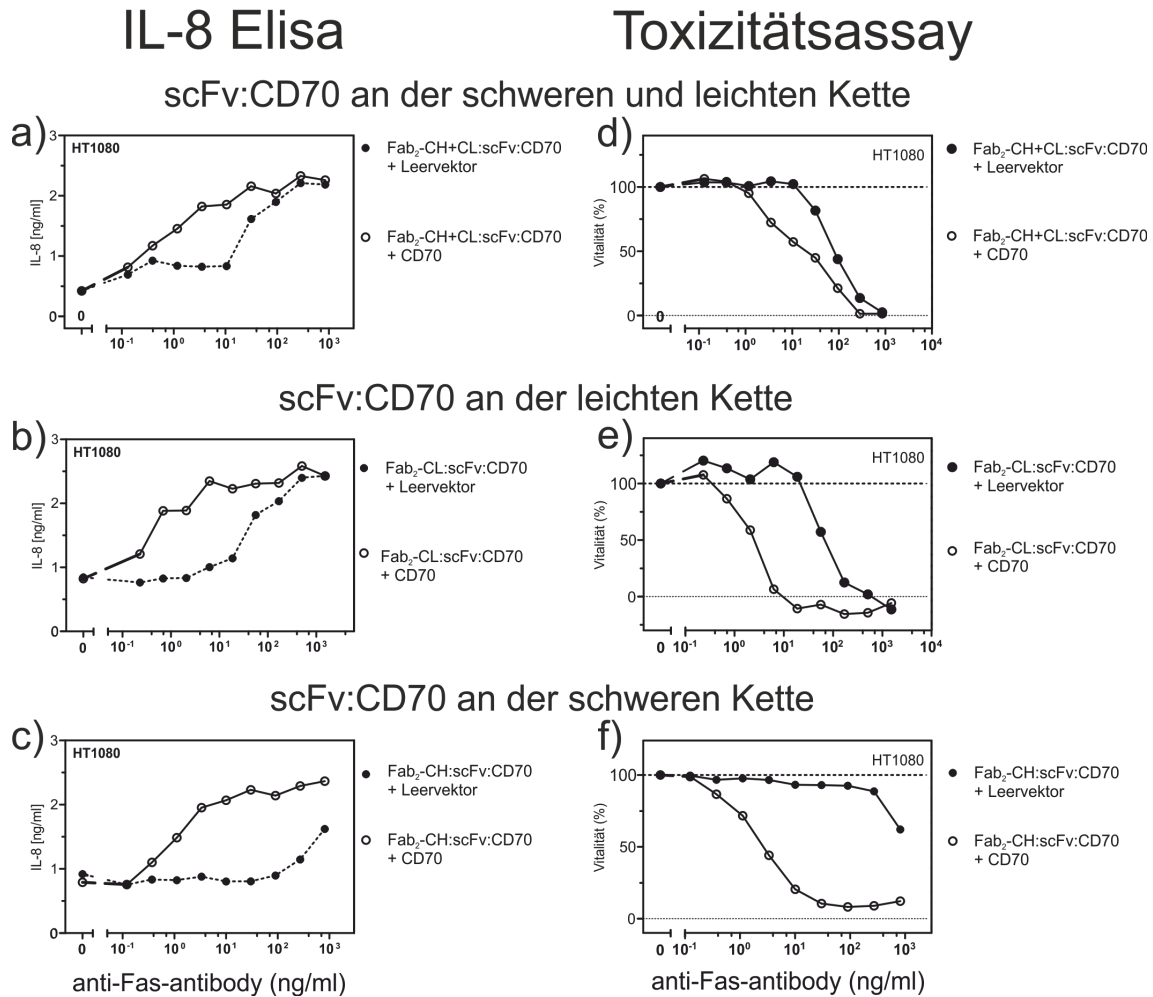


Abbildung 13: Gegenüberstellung der agonistischen Aktivität des anti-Fas-Fab₂ Antikörpers mit scFv:CD70 an verschiedenen Stellen anhand von IL-8 Elisa und Kristallviolett-Toxizitätsassays

Der Versuchsaufbau war identisch mit dem in Abbildung 9, beziehungsweise Abbildung 11. Verglichen wurden hierbei die Antikörper anti-Fas-Fab₂-CH+CL:scFv:CD70, anti-Fas-Fab₂-CL:scFv:CD70 und anti-Fas-Fab₂-CH:scFv:CD70. Am nächsten Tag wurde der IL-8-Gehalt im Überstand bzw. die Vitalität der HT1080 Zellen über eine Kristallviolettfärbung bestimmt. Die Konzentrationen wurden hierbei wiederum in Triplikaten angelegt und die gemessenen Werte gemittelt.

Tabelle 4: CD70-abhängige Fas-Aktivierbarkeit verschiedener anti-Fas-Fusionsproteine (EC_{50} -Werte aus Abbildung 13 a) b) und c))

Konstruktnamen	EC_{50} bei CD70-negativen Zellen	EC_{50} bei CD70-positiven Zellen	Quotient
α Fas-Fab ₂ -CH:scFv:CD70-LC-scFv:CD70	21,6	0,83	26,0
α Fas-Fab ₂ -CL:scFv:CD70	39,8	0,46	86,5
α Fas-Fab ₂ -CH:scFv:CD70	670	1,6	418,8

Vergleicht man die EC_{50} -Werte der IL-8-Elisa Assays der Abb. 13 a), b) und c) miteinander, zeigt sich ein deutlicher Unterschied. Eine gesteigerte Anzahl an scFv:CD70-Domänen vermindert den Faktor zwischen der EC_{50} bei CD70-positiven und negativen Ko-Kulturzellen deutlich im Vergleich mit der Variante, bei der die scFv:CD70 Domäne nur an eine Kette kloniert wurde.

Diese Beobachtung bestätigt sich auch im Toxizitätsassay. Vergleicht man die Daten in Abbildung 13 d) mit e) und f) ist in d) ein deutlich geringerer Konzentrationsfaktor zwischen den Ko-Kulturzellen mit CD70 und den Kontrollzellen zu erkennen, um einen gleichen Effekt auf die Apoptose-Aktivität der Zielzellen zu erreichen.

Weiterhin zeigt sich die Überlegenheit von anti-Fas-Fab₂ mit scFv:CD70 an der schweren Kette gegenüber anti-Fas-Fab₂ mit scFv:CH70 an der leichten Kette. Vergleicht man die Daten in Abbildung 13 b) und c), sowie e) und f), ist ein bedeutend größerer Unterschied zwischen den Verdünnungsreihen mit CD70 positiven und negativen Zellen zu erkennen. Dies lässt sich auch an der in Tabelle 4 aufgelisteten EC_{50} Werten erkennen.

4.4 Analyse der CD70-abhängigen Aktivität der gereinigten Fab₂-Antikörper-Fusionsproteine

In den vorhergehenden Versuchen zeigte sich das Fab₂-Konstrukt dem hIgG1 Antikörper und der N297A-Variante als überlegen. Weiterhin wurde in Abschnitt 4.3.4 gezeigt, dass die scFv:CD70 Domäne am C-Terminus der schweren Kette am

besten positioniert ist. Aus diesen Gründen wurden für die weiteren Versuche die Antikörper-Fusionsproteine anti-CD40-Fab₂-CH:scFv:CD70 und anti-Fas-Fab₂-CH:scFv:CD70 in großer Menge produziert und anschließend mittels Flag-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Mit Hilfe von SDS-Page und anschließender Silberfärbung wurden die aufgereinigten Proteine analysiert. Hierdurch konnte die Qualität der Aufreinigung überprüft und die Proteinkonzentration anhand einer Proteinmarker-Mixtur bestimmt werden.

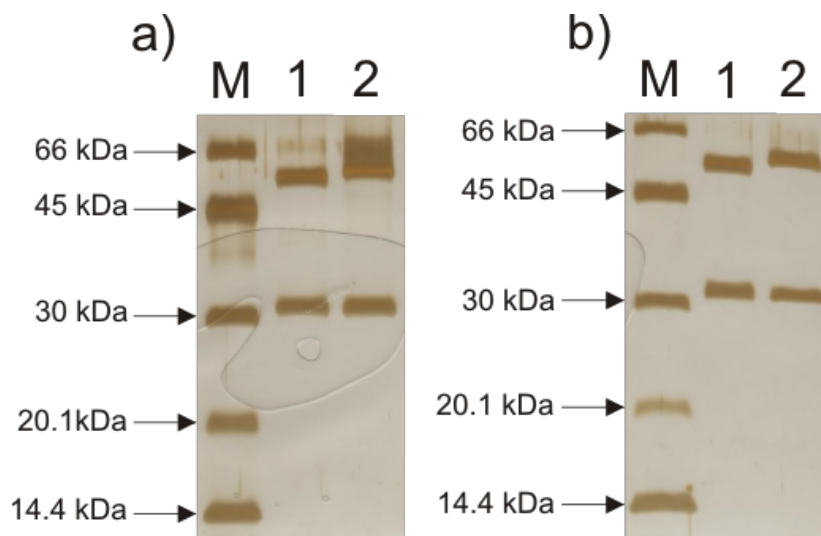


Abbildung 14: Silberfärbung zur quantitativen und qualitativen Analyse der aufgereinigten Antikörper-Fusionsproteine.

Nach einer Westernblot Konzentrationsbestimmung, wurden jeweils 100ng des Proteins auf ein SDS-Gel aufgetragen, um durch Silberfärbung die Quantität, sowie die Qualität der aufgereinigten Fusionsproteine zu überprüfen. Neben den selbst aufgereinigten Fab₂-Konstrukten, wurden zum Vergleich die parentalen Antikörper in gleicher Menge aufgetragen. a) 1: anti-CD40-hIgG1; 2: anti-CD40-Fab₂-CH:scFv:CD70; b) 1: anti-Fas-Fab₂-CH:scFv:CD70; M: Silbergelmarker.

Wie in Abbildung 14 zu erkennen ist, war die Reinigung sehr effizient und die gereinigten Proteine somit für die folgenden Experimente gut verwendbar. Um zu überprüfen, ob die CD70-abhängige Funktionalität auch nach der Aufreinigung erhalten geblieben ist, wurde mit dem Konstrukt anti-CD40-Fab₂-CH:scFv:CD70 ein IL-8-Induktions-Experiment vergleichend mit Überstand und dem aufgereinigten Protein durchgeführt (Abb. 15). Für anti-Fas-Fab₂-CH:scFv:CD70

wurde in gleicher Weise ein IL-8 Elisa angefertigt und weiterhin ein Zytotoxizitätsexperiment, entsprechend Abschnitt 4.3.3.

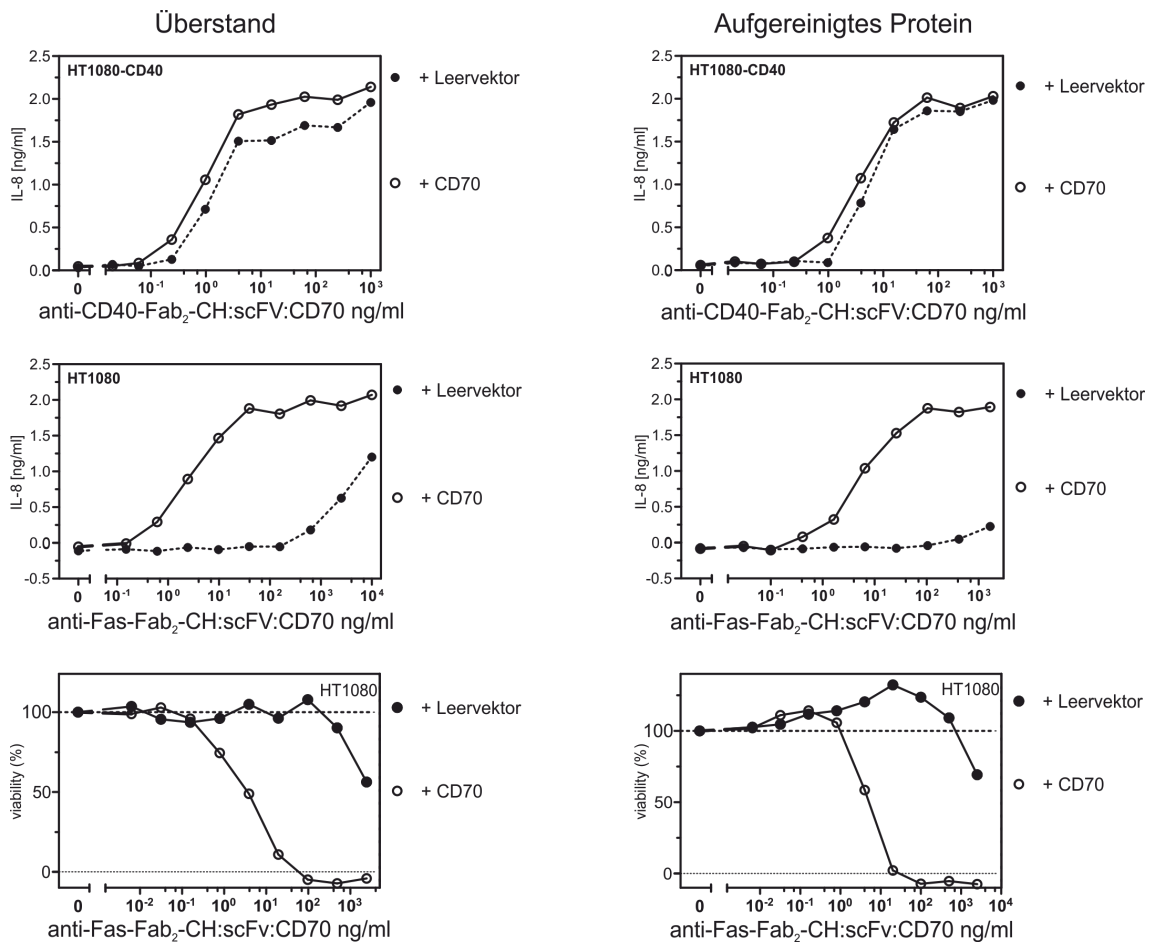


Abbildung 15: Gegenüberstellung der agonistischen Aktivität der Fab₂-Konstrukte vor und nach der Aufreinigung über den FLAG-Tag

Der Versuchsaufbau der IL-8 Elisa war identisch mit dem in Abbildung 9 beziehungsweise Abbildung 11 für das Zytotoxizitätsassay. Verglichen wurde jeweils das Protein im Überstand mit dem aufgereinigtem Protein.

Vergleicht man nun jeweils die Dosis-Wirkungsbeziehung des aufgereinigten Proteins mit dem des Überstandes, zeigt sich, dass die Aufreinigung über den FLAG-Tag keine relevante Aktivitätsänderung nach sich zieht.

4.5 Untersuchung der CD70-abhängigen Rezeptor-Aktivierung anhand verschiedener CD70-exprimierender Ko-Kulturzellen

Es wurde in dieser Arbeit bereits nachgewiesen, dass die untersuchten Antikörper-Fusionsproteine mit scFv:CD70-Anchoring-Domäne in Anwesenheit von CD70 positiven Zellen einen wesentlich größeren Effekt auf die Zielzellen haben als ohne entsprechende Zellen. Daraus resultierte die nachfolgende Fragestellung, in wie weit dieser Effekt von der CD70-Dichte auf der Ko-Kulturzelle abhängt. Hierzu wurden unterschiedliche CD70-positive Zelllinien getestet. Es wurden die Zelllinien Daudi, Ramos, BJAB und Raji miteinander verglichen, Jurkat wurde wiederum als Negativkontrolle verwendet. Zuerst wurde mittels Durchflusszytometrie ein Maß für die CD70-Expression auf den verschiedenen Zellen ermittelt. (siehe Abbildung 16).

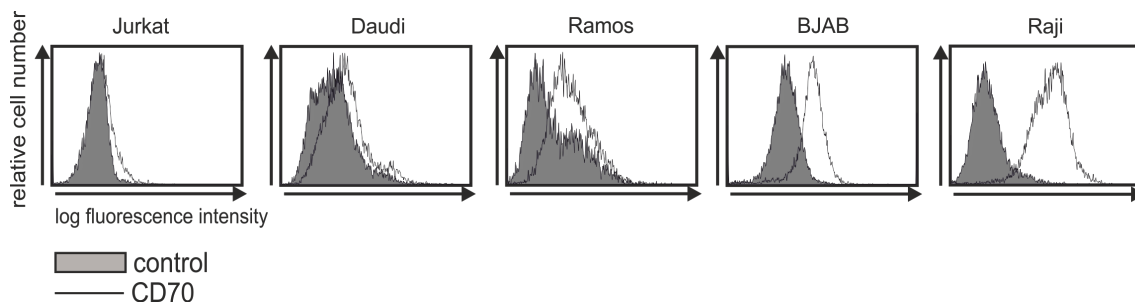


Abbildung 16: Affinitätsbestimmung der Fab₂-Konstrukte an CD70 der verschiedenen Zelllinien

FACS-Analyse der Zelllinien Jurkat, Daudi, Ramos, BJAB und Raji in Hinblick auf ihre CD70 Expression. Hierzu wurde ein FITC-gelabeltet anti-CD70-Antikörper verwendet.

Wie in Abbildung 16 zu erkennen ist, steigt die Fluoreszenz-Intensität von Daudi-Zellen über Ramos und BJAB-Zellen hin zu Raji-Zellen im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle an. Daran zeigt sich, dass der verwendete CD70-Antikörper an die Zelllinien in folgender Reihenfolge eine jeweils höhere Bindung aufweist: Jurkat (keine Expression), Daudi (schwache Expression), Ramos und BJAB (mittlere Expression) und Raji (hohe Expression).

Anschließen sollte überprüft werden, ob - und in welchem Ausmaß - die höhere Bindung der scFv:CD70 Domäne an die verschiedenen Zelllinien, eine Auswirkung auf den Effekt der Antikörper-Fusionsproteine auf die Zielzellen HT1080-CD40 und HT1080 hat. Hierzu wurde für anti-CD40-Fab₂-CH:scFv:CD70 ein IL-8 Elisa als Ko-Kultur mit den verschiedenen Zelllinien durchgeführt. Auf gleiche Art und Weise wurde ein IL-8 Elisa und ein Zytotoxizitätsexperiment für anti-Fas-Fab₂-CH:scFv:CD70 angefertigt.

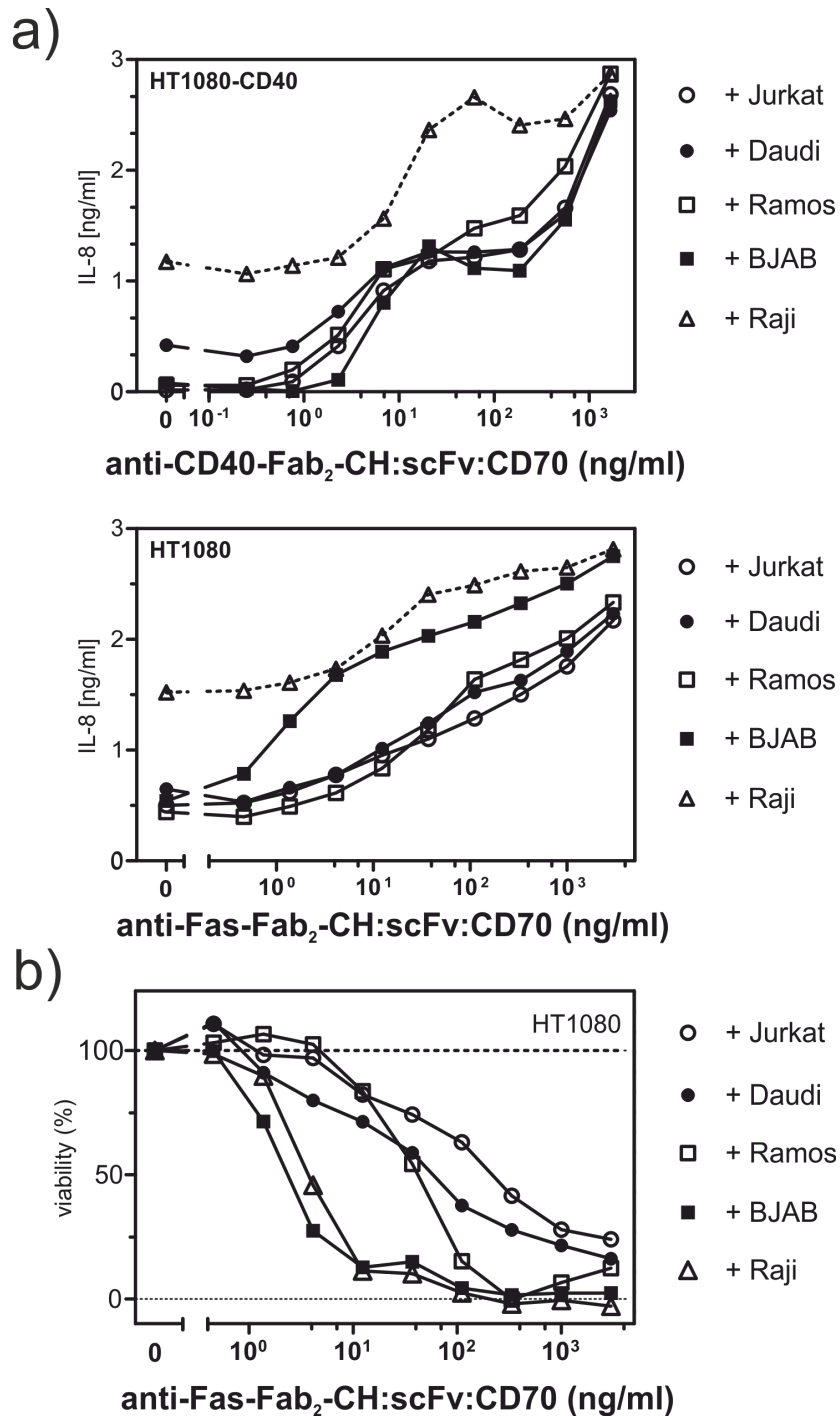


Abbildung 17: Gegenüberstellung der agonistischen Aktivität der Fab₂-Konstrukte anti-CD40-Fab₂-CH:scFv:CD70 und anti-Fas-Fab₂-CH:scFv:CD70 auf HT1080 bzw. HT1080-CD40 Zellen in Ko-Kultur mit verschiedenen Suspensionszellen

Versuchsaufbau simultan zu dem in Abbildung 9, beziehungsweise Abbildung 11, beschrieben. Als Ko-Kulturzellen wurden jeweils 6×10^4 Zellen pro Well der

angegebenen Suspensionszellen verwendet. Verglichen wurde die IL-8 Sekretion der Zellen (a) und die induzierte Apoptose Aktivität bei anti-Fas-Fab₂-CH:scFv:CD70 (b).

In Abbildung 17 a) fällt bei anti-CD40-Fab₂-CH:scFv:CD70 keine nennenswerte unterschiedliche IL-8-Sekretion der HT1080-CD40 Zellen auf. Die Ausnahme hierbei bildet die Raji Zelllinie, bei denen sogar in Abwesenheit der Antikörper ein, im Vergleich zu den anderen Zelllinien, gesteigerter IL-8 Gehalt zu messen ist. Hier lässt sich auch ein CD70-abhängiger Effekt ablesen im Vergleich zu den anderen Ko-Kulturzellen, was in Form eines vergrößerten EC₅₀-Wertes in Erscheinung tritt. Durch den vergrößerten IL-8 Hintergrund bei der Raji Zelllinie ist dieser Shift nicht eindeutig auf die Dichte von CD70 zurückzuführen. Gleiches, jedoch in abgeschwächter Form, ist bei der Daudi Zelllinie zu beobachten.

Im Falle des anti-Fas-Antikörpers entsteht in Abbildung 17 a) kein signifikanter Unterschied in der IL-8 Sekretion der Zellen, wenn Jurkat, Daudi oder Ramos Zelllinien als Ko-Kulturzellen eingesetzt werden. Wie schon in früheren Experimenten gezeigt, wirkt sich allerdings BJAB als Ko-Kulturzelle positiv auf die NFκB-Aktivierung aus. Die Zelllinie Raji zeigt, wie im Falle des anti-CD40 Antikörpers, bereits ohne und in sehr geringer Antikörperkonzentration einen im Vergleich hohen IL-8 Gehalt. Auch hier resultiert wie bei dem anti-CD40-Antikörper ein vergrößerter EC₅₀-Wert. Bei größer werdenden Konzentrationen ist allerdings kein nennenswerter Unterschied zu BJAB als Ko-Kulturzelle zu erkennen.

Abbildung 17 b) zeigt die anti-Fas induzierte Apoptose Aktivität der HT1080 Zellen. Hier zeigt sich, dass die jeweiligen Zelllinien, in Abhängigkeit ihrer Bindungseigenschaften zu CD70, einen immer größeren Effekt auf die Zielzellen HT1080 haben. Bei BJAB und Raji als Ko-Kulturzellen ist allerdings kein signifikanter Unterschied mehr messbar. Ebenso ist hier nicht der Effekt zu beobachten, dass die Raji Zelllinie in Abwesenheit von Antikörpern eine Rezeptoraktivierung mit sich bringt.

5. Diskussion

Monoklonale Antikörper sind die am stärksten wachsende Gruppe von neu zugelassenen Medikamenten. Innerhalb dieser Gruppe sind Antikörper des IgG1 Isotyps am stärksten vertreten. Agonistische monoklonale Antikörper sind beispielsweise in der Lage, Rezeptoren der TNFRSF in Tumorzellen zu aktivieren und auf diese Weise zum Beispiel den programmierten Zelltod in Zellen auszulösen oder Immunzellen zu aktivieren, um die Anti-Tumor-Immunantwort zu verstärken (Brezski and Georgiou 2016).

Aus diesem Grund beschäftigt sich die Forschung in den letzten Jahren vermehrt mit der Entwicklung und Verbesserung von Antikörpern. So zum Beispiel mit der Erforschung des Aktivierungsvorganges von Rezeptoren der TNFRSF durch monoklonale Antikörper. So zeigte sich zum Beispiel, dass eine einfache Rezeptorbindung durch lösliche Liganden und Antikörper nicht ausreicht, um TNF-Rezeptor-aktivierend zu wirken. Daraus resultierte die Erkenntnis, dass eine sekundäre Bildung von transaktivierenden Antikörper-Rezeptor-Komplexen nötig ist, um Rezeptor-assoziierte Signalwege zu aktivieren. Dies kann *in vivo* durch eine Bindung der Antikörper an Fc γ -Rezeptoren und die damit verbundene räumliche Ausrichtung und lokale Konzentrationserhöhung in der Zell-Zell-Kontaktzone erreicht werden (Wajant 2015).

Diese Arbeit beschäftigte sich mit der Frage, ob die Bildung von transaktivierenden Antikörper-Rezeptor-Komplexen auch mittels Immobilisierung über eine andere Gruppe von membranständigen Molekülen erfolgen kann als die Klasse der Fc γ -Rezeptoren. Sollte dies der Fall sein, so wäre es bei geeigneten Targets möglich, Antikörper zu generieren, deren Wirkung vor allem dort auftritt, wo sie gewünscht wird. Um dieses Prinzip zu untersuchen, wurde beispielhaft der TNFRSF Ligand CD70 als Zielstruktur ausgewählt. Das heißt, es sollte erreicht werden, dass die Aktivierung von Rezeptoren der TNFRSF nur in Geweben erfolgt, in denen CD70-positive Zellen vorkommen.

Um diese Idee zu verifizieren, wurden in dieser Arbeit anti-CD40 und anti-Fas Antikörper-Fusionsproteine kloniert und analysiert, die jeweils mit Anchoring-Domänen versehen waren, die an CD70 binden.

Es zeigt sich bei allen scFv:CD70 modifizierten Antikörper-Fusionsproteinen ein Signal bei deutlich geringeren Konzentrationen, wenn CD70-positive Ko-Kulturzellen im Vergleich zu CD70-negativen Ko-Kulturzellen verwendet wurden oder der parentale Antikörper eingesetzt wurde. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass eine Bindung der modifizierten Antikörper an CD70 erfolgt und diese somit immobilisiert und räumlich ausgerichtet werden. Wie bereits beschrieben, könnte dies die Bildung von transaktivierenden Antikörper-Rezeptor-Komplexen begünstigen (Wajant 2015).

Eine weitere Beobachtung war die erhöhte Aktivität der modifizierten Antikörper anti-CD40(hIgG1)-CH:scFv:CD70 und anti-CD40(N297A)-CH:scFv:CD70 mit CD70-negativen Zellen im Vergleich zu den parentalen Kontroll-Antikörpern. Dem könnte eine Aggregation der Antikörper während der Produktion oder der Lagerung zugrunde liegen. Da durch aggregierte Antikörper bekanntermaßen ebenfalls transaktivierende Antikörper-Rezeptor-Komplexe gebildet werden können (Wajant 2015), könnte auch dies zur Rezeptoraktivierung führen.

Da anti-Fas Antikörper Apoptose induzieren können, konnten im Falle der anti-Fas-Konstrukte auch Zytotoxizitätsexperimente zur Rezeptoraktivierung durchgeführt werden. Es resultierten Daten, die die Ergebnisse aus den vorherigen Assays bestätigten. Es zeigte sich eine starke Abhängigkeit der Aktivierung der Rezeptoren von der Anwesenheit von CD70 auf den Ko-Kulturzellen. Um zu zeigen, dass es sich bei dem durch die α Fas-Konstrukte induzierten Zelltod, um Apoptose und nicht um Nekroptose handelt, wurde ein weiterer Versuch durchgeführt, bei dem anti-Fas(Fab₂)-CH:scFv:CD70 mit CD70-positiven Zellen und zusätzlich in Gegenwart oder Abwesenheit des Caspase-8 Inhibitors zVAD-FMK (siehe Abbildung 12) inkubiert wurde. Durch das Überleben der Zellen, die mit zVAD-FMK vorinkubiert wurden, konnte gezeigt werden, dass dem Versterben der Zellen Apoptose zugrunde liegt.

Die zentrale Frage dieser Arbeit, ob eine Fc γ R-unabhängige Immobilisierung und damit einhergehend eine verstärkte Aktivierung der TNFRSF-Rezeptoren CD40 und CD95 durch andere Zielstrukturen als den Fc γ -Rezeptoren zustande kommen kann, konnte somit positiv beantwortet werden. Es sollte daher untersucht werden, an welcher Position die scFv:CD70 Anchoring-Domäne den größten Effekt aufweist und ob dieser Effekt durch mehrere scFv:CD70-Domänen noch verstärkt werden kann. Da es in vorhergehenden Versuchen den größten Effekt zeigte und nicht zur Aggregation neigte, wurde hierfür exemplarisch das Fab₂-Konstrukt des anti-Fas Antikörpers verwendet. Betrachtet man Abbildung 13 und Tabelle 4, zeigt sich ein deutlich geringerer Quotient zwischen der EC₅₀ von CD70-positiven und -negativen Ko-Kulturzellen bei mehreren scFv:CD70 im Vergleich zu nur einem Paar von scFv:CD70. Der Grund hierfür könnte in einer durch die Verdopplung begünstigten Aggregation der modifizierten Antikörper-Fusionsproteine liegen.

Im Vergleich der beiden modifizierten Antikörper mit lediglich einer scFv:CD70-Domäne an der schweren bzw. an der leichten Kette zeigt sich die Positionierung an der schweren Kette deutlich überlegen. Dass die Bindung durch eine scFv:CD70-Domäne am C-Terminus der leichten Kette ein geringeres CD70-abhängiges Aktivierungspotential aufweist, könnte dadurch erklärt werden, dass das Fab₂-Fragment durch diese Bindung räumlich ungünstig ausgerichtet vorliegt und beispielsweise nicht mehr beide Antigenbindungsdomänen in der Lage sind an Fas zu binden und diesen zu aktivieren. Eine andere denkbare Erklärung könnte darin bestehen, dass zwei scFv:CD70-Domänen eine räumliche Nähe zueinander benötigen, um in Kombination die nötige CD70-Bindung hervorzurufen. Diese räumliche Nähe könnte durch die C-terminale Positionierung an den schweren Ketten gegeben sein, nicht aber an den weiter entfernt liegenden leichten Ketten.

Aus diesen Versuchen kristallisierte sich das Fab₂-Konstrukt mit der Modifikation an der schweren Kette als das wirksamste heraus. Aus diesem Grund wurde für die weiteren Versuche anti-CD40(Fab₂)-CH:scFv:CD70 und anti-Fas(Fab₂)-CH:scFv:CD70 in großen Mengen produziert und über den FLAG-Tag aufgereinigt.

Um zu überprüfen, in wie weit die Aktivierung der Rezeptoren der TNFRSF von der Stärke der CD70-Expression der Ko-Kulturzelle abhängt, wurden verschiedene CD70 positive Zelllinien als Ko-Kulturzelle miteinander verglichen. Um ein relatives Maß für die Rezeptorzahl pro Zelle zu erhalten, wurden die CD70-Expression mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Die daraufhin durchgeführten IL-8 Elisas und die Zytotoxizitätsassays mit den verschiedenen Ko-Kulturzellen zeigten folgende Ergebnisse (Abbildung 17): Bei dem anti-CD40 Antikörper konnte kein Unterschied zwischen den Zelllinien ausgemacht werden. Es wird vermutet, dass die durch die Aufreinigung verstärkte Aggregation bereits weit vorangeschritten ist, sodass die Aktivierung der TNFRSF Rezeptoren auch ohne Ko-Kulturzelle vonstatten gehen konnte. Die Versuche mit der Raji-Zelllinie zeigten jedoch eine deutlich gesteigerte IL-8 Konzentration im Vergleich zu allen anderen Zelllinien, sogar in völliger Abwesenheit von Antikörpern. Vermutlich besitzen Raji-Zellen einen membranständigen Liganden für einen TNFRSF Rezeptor der HT1080-CD40 Zellen, wodurch eine Aktivierung dieser Rezeptoren vonstatten geht. Ebenso ist bei Verwendung von Raji als Ko-Kulturzellen ein vergrößerter EC_{50} -Wert auffällig. Durch den hohen Hintergrund ist dieses Ergebnis jedoch nicht auf die CD70-Rezeptordichte zurückzuführen. Die gleichen Effekte zeigen sich auch beim IL-8 Elisa mit anti-Fas Antikörpern. Hier ist allerdings die schon zuvor mehrfach beobachtete verstärkte Aktivität bei BJAB als Ko-Kulturzelle zu sehen. Bei Daudi und Ramos ist allerdings keine Verringerung des EC_{50} -Wertes im Vergleich zur Jurkat Kontrolllinie zu erkennen. Dies lässt darauf schließen, dass die CD70 Rezeptordichte auf diesen Zelllinien zu gering ist, um eine verstärkte Aktivierung der TNFRSF Rezeptoren nach sich zu ziehen.

Betrachtet man das Zytotoxizitätsexperiment, zeigt sich jedoch ein anderes Bild. Zunächst ist die induzierte Apoptose allein durch Raji-Zellen nicht zu beobachten, was darauf schließen lässt, dass der Rezeptor, der durch membrangebundene Liganden der Raji-Zellen aktiviert wird, nicht zu den Todesrezeptoren gehört. Ein weiterer Unterschied zum IL-8 Elisa ist, dass sich mit steigender Fluoreszenz in der FACS-Analyse der Zellen (Abbildung 16) eine gesteigerte Aktivität beim Zytotoxizitätsassay ableiten lässt. Allerdings ist zwischen der BJAB und der Raji

Zelllinie kein Unterschied mehr auszumachen. Daraus lässt sich eine Art Sättigung der benötigten Rezeptordichte schließen. Aus der Tatsache, dass beim Zytotoxizitätsassay sogar bei der Daudi Zelllinie eine verstärkte Aktivität beobachtet werden kann – im Gegensatz zum IL-8 Elisa – beweist, dass für die Apoptose Induktion eine geringere Rezeptordichte von Nöten ist, als zur IL-8 Sekretion.

Zukünftig wäre noch zu klären, ob der nachgewiesene verstärkende Effekt auch mit weiteren Rezeptoren in vergleichbarer Weise nachgewiesen werden kann. Weiterhin ist eine Lösung für das Aggregationsproblem im Falle von anti-CD40 Antikörpern zu finden, bzw. ob dies auch bei Verwendung einer anderen Modifikation auftritt. Als Experiment-Vorschlag kann hier die Gelfiltration genannt werden, um zu überprüfen, ob die Antikörper tatsächlich aggregieren. Falls ja, kann anhand unterschiedlich lange gelagerten Antikörpern erörtert werden, wie schnell der Vorgang vonstatten geht. Im Zuge dessen kann auch der Einfluss der Lagerungstemperatur überprüft werden.

6. Zusammenfassung

Monoklonale Antikörper bilden einen Großteil der heutzutage neu entwickelten Medikamente. Ihr Erfolg resultiert aus ihrer großen Vielfältigkeit und gleichzeitiger Spezifität, ein bestimmtes Target gezielt zu erkennen und zu beeinflussen. So sind spezifische Antikörper gegen Rezeptoren der TNFRSF ein interessanter Ansatz in der Tumorthherapie. Um bei TNFRSF-Rezeptoren ein adäquates intrazelluläres Signal zu erhalten, ist es jedoch in der Regel nicht ausreichend, dass ein Antikörper an einen einzelnen oder zwei Rezeptoren bindet, sondern es ist die Entstehung von supramolekularen transaktivierenden Antikörper-Rezeptor-Komplexen nötig. Dies geschieht *in vivo* durch eine Immobilisierung und räumliche Ausrichtung der Antikörper durch Bindung an Fc γ -Rezeptoren mithilfe ihrer Fc-Bindungsstelle im konstanten Teil der schweren Kette.

Da Fc γ -Rezeptoren sehr häufig und nicht gewebespezifisch exprimiert werden, würde ein systemisch verabreichter Antikörper nahezu im gesamten Körper seinen spezifischen TNFRSF Rezeptor aktivieren. Diese Dissertation beschäftigt sich mit der Frage, ob eine Immobilisierung der Antikörper auch durch andere Zielstrukturen als Fc γ -Rezeptoren erfolgen kann. Exemplarisch wurde das T-Zell-spezifische membranständige Antigen CD70 als Zielstruktur gewählt. Hierzu wurden anti-CD40 und anti-Fas Antikörper mit einer CD70-spezifischen scFv:CD70 Domäne fusioniert.

Es konnte zunächst gezeigt werden, dass sich die Antikörper sowohl als IgG1-Isotyp als auch in Form des Fab₂ Konstruktes und einer Fc γ R-bindungsdefizienten Variante (N297A Mutation) mit dem C-terminalen scFv:CD70-Fragment gut produzieren lassen. In den nachfolgenden Experimenten konnte bestätigt werden, dass sich durch die Modifizierung eine CD70-abhängige Signalaktivierung induzieren lässt. Das Fab₂-Konstrukt erwies sich bei diesen Versuchsreihen als das Effektivste. Des Weiteren wurde beobachtet, dass eine Positionierung der scFv:CD70-Domäne am C-Terminus der schweren Kette die stärkste

Rezeptoraktivierung bewirkt und dass eine Steigerung der Anzahl dieser scFv:CD70-Domänen keine weitere Erhöhung der Rezeptoraktivierung verursacht. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde überprüft, in wie weit eine solche CD70-abhängige CD40- bzw. Fas-spezifische Rezeptoraktivierung von der Quantität der CD70-Expression auf der Ko-Kulturzelle abhängt. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Frage nicht einheitlich für die unterschiedlichen Signalwege beantworten lässt. So steigt das intrazelluläre Signal beim NFκB-Signalweg erst bei einer deutlich höheren CD70-Expression als bei der induzierten Apoptose. Bei letzterer konnte eine Art Sättigung für die Abhängigkeit von CD70 gezeigt werden.

7. Literaturverzeichnis

A. Janeway, P. T. (1994). Immunobiology. Berlin Oxford, Spektrum Akademischer Verlag.

Aggarwal, B. B. (2003). "Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword." Nat Rev Immunol **3**(9): 745-756.

Aggarwal, B. B., S. C. Gupta and J. H. Kim (2012). "Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey." Blood **119**(3): 651-665.

Arduin, E., S. Arora, P. R. Bamert, T. Kuiper, S. Popp, S. Geisse, R. Grau, T. Calzascia, G. Zenke and J. Kovarik (2015). "Highly reduced binding to high and low affinity mouse Fc gamma receptors by L234A/L235A and N297A Fc mutations engineered into mouse IgG2a." Mol Immunol **63**(2): 456-463.

Baeuerle, P. A. and T. Henkel (1994). "Function and activation of NF-kappa B in the immune system." Annu Rev Immunol **12**: 141-179.

Bhardwaj, A. and B. B. Aggarwal (2003). "Receptor-mediated choreography of life and death." J Clin Immunol **23**(5): 317-332.

Bodmer, J. L., P. Schneider and J. Tschopp (2002). "The molecular architecture of the TNF superfamily." Trends Biochem Sci **27**(1): 19-26.

Bonizzi, G. and M. Karin (2004). "The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity." Trends Immunol **25**(6): 280-288.

Brezski, R. J. and G. Georgiou (2016). "Immunoglobulin isotype knowledge and application to Fc engineering." Curr Opin Immunol **40**: 62-69.

Bullock, T. N. (2017). "TNF-receptor superfamily agonists as molecular adjuvants for cancer vaccines." Curr Opin Immunol **47**: 70-77.

Burdin, N., C. Van Kooten, L. Galibert, J. S. Abrams, J. Wijdenes, J. Banchereau and F. Rousset (1995). "Endogenous IL-6 and IL-10 contribute to the differentiation of CD40-activated human B lymphocytes." J Immunol **154**(6): 2533-2544.

Cao, J., F. Meng, X. Gao, H. Dong and W. Yao (2011). "Expression and purification of a natural N-terminal pre-ligand assembly domain of tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1 PLAD) and preliminary activity determination." Protein J **30**(4): 281-289.

Chan, F. K., H. J. Chun, L. Zheng, R. M. Siegel, K. L. Bui and M. J. Lenardo (2000). "A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling." Science **288**(5475): 2351-2354.

Chao, D. T., X. Ma, O. Li, H. Park and D. Law (2009). "Functional characterization of N297A, a murine surrogate for low-Fc binding anti-human CD3 antibodies." Immunol Invest **38**(1): 76-92.

Chen, G., P. Cao and D. V. Goeddel (2002). "TNF-induced recruitment and activation of the IKK complex require Cdc37 and Hsp90." Mol Cell **9**(2): 401-410.

- Cho, G. J., E. S. Lee, H. M. Jin, J. H. Lee, Y. S. Kim, M. J. Oh, H. J. Seol, S. C. Hong and H. J. Kim (2015). "Placental expression of D6 decoy receptor in preeclampsia." Obstet Gynecol Sci **58**(5): 333-339.
- Debatin, K. M. and P. H. Krammer (2004). "Death receptors in chemotherapy and cancer." Oncogene **23**(16): 2950-2966.
- Dhein, J., P. T. Daniel, B. C. Trauth, A. Oehm, P. Moller and P. H. Krammer (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**(10): 3166-3173.
- Eliopoulos, A. G. and L. S. Young (2004). "The role of the CD40 pathway in the pathogenesis and treatment of cancer." Curr Opin Pharmacol **4**(4): 360-367.
- Engelmann, H., H. Holtmann, C. Brakebusch, Y. S. Avni, I. Sarov, Y. Nophar, E. Hadas, O. Leitner and D. Wallach (1990). "Antibodies to a soluble form of a tumor necrosis factor (TNF) receptor have TNF-like activity." J Biol Chem **265**(24): 14497-14504.
- Fesik, S. W. (2000). "Insights into programmed cell death through structural biology." Cell **103**(2): 273-282.
- Fusco, A. J., O. V. Savinova, R. Talwar, J. D. Kearns, A. Hoffmann and G. Ghosh (2008). "Stabilization of RelB requires multidomain interactions with p100/p52." J Biol Chem **283**(18): 12324-12332.
- Gaur, U. and B. B. Aggarwal (2003). "Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily." Biochem Pharmacol **66**(8): 1403-1408.
- Geiger, C. (2017). "Entwicklung und Charakterisierung von TNFR2-spezifischen Agonisten."
- Ghosh, G., G. van Duyne, S. Ghosh and P. B. Sigler (1995). "Structure of NF-kappa B p50 homodimer bound to a kappa B site." Nature **373**(6512): 303-310.
- Ghosh, S., M. J. May and E. B. Kopp (1998). "NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses." Annu Rev Immunol **16**: 225-260.
- Grell, M., H. Wajant, G. Zimmermann and P. Scheurich (1998). "The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(2): 570-575.
- Grewal, I. S. and R. A. Flavell (1998). "CD40 and CD154 in cell-mediated immunity." Annu Rev Immunol **16**: 111-135.
- Hansel, T. T., H. Kropshofer, T. Singer, J. A. Mitchell and A. J. George (2010). "The safety and side effects of monoclonal antibodies." Nat Rev Drug Discov **9**(4): 325-338.
- Hayden, M. S. and S. Ghosh (2008). "Shared principles in NF-kappaB signaling." Cell **132**(3): 344-362.
- Hayden, M. S. and S. Ghosh (2012). "NF-kappaB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions." Genes Dev **26**(3): 203-234.

- Hintzen, R. Q., S. M. Lens, G. Koopman, S. T. Pals, H. Spits and R. A. van Lier (1994). "CD70 represents the human ligand for CD27." Int Immunol **6**(3): 477-480.
- Holler, N., R. Zaru, O. Micheau, M. Thome, A. Attinger, S. Valitutti, J. L. Bodmer, P. Schneider, B. Seed and J. Tschopp (2000). "Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule." Nat Immunol **1**(6): 489-495.
- Jacobs, M. D. and S. C. Harrison (1998). "Structure of an IkappaBalpha/NF-kappaB complex." Cell **95**(6): 749-758.
- Jefferis, R. and D. S. Kumararatne (1990). "Selective IgG subclass deficiency: quantification and clinical relevance." Clin Exp Immunol **81**(3): 357-367.
- Kapur, R., H. K. Einarsdottir and G. Vidarsson (2014). "IgG-effector functions: "the good, the bad and the ugly"." Immunol Lett **160**(2): 139-144.
- Karin, M. and Y. Ben-Neriah (2000). "Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity." Annu Rev Immunol **18**: 621-663.
- Kaufmann, S. H. E. (2014). Basiswissen Immunologie. Berlin Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg.
- Krammer, P. H. (2000). "CD95's deadly mission in the immune system." Nature **407**(6805): 789-795.
- Kumar, A., W. Abbas and G. Herbein (2013). "TNF and TNF receptor superfamily members in HIV infection: new cellular targets for therapy?" Mediators Inflamm **2013**: 484378.
- Kumar, M., D. Y. Makonchuk, H. Li, A. Mittal and A. Kumar (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**(4): 2439-2448.
- Kumar, R., P. E. Herbert and A. N. Warrens (2005). "An introduction to death receptors in apoptosis." Int J Surg **3**(4): 268-277.
- Kums, J. (2017). "Entwicklung und Charakterisierung von Gaussia princeps Luziferase-Antikörper-Fusionsproteinen."
- Lee, H. S. and W. Im (2017). "Effects of N-Glycan Composition on Structure and Dynamics of IgG1 Fc and Their Implications for Antibody Engineering." Sci Rep **7**(1): 12659.
- Li, H. and X. Lin (2008). "Positive and negative signaling components involved in TNFalpha-induced NF-kappaB activation." Cytokine **41**(1): 1-8.
- Li, J., Q. Yin and H. Wu (2013). "Structural basis of signal transduction in the TNF receptor superfamily." Adv Immunol **119**: 135-153.
- Li, Q. and I. M. Verma (2002). "NF-kappaB regulation in the immune system." Nat Rev Immunol **2**(10): 725-734.

- Liu, H. and K. May (2012). "Disulfide bond structures of IgG molecules: structural variations, chemical modifications and possible impacts to stability and biological function." MAbs **4**(1): 17-23.
- Liu, X. Y., L. M. Pop and E. S. Vitetta (2008). "Engineering therapeutic monoclonal antibodies." Immunol Rev **222**: 9-27.
- Locksley, R. M., N. Killeen and M. J. Lenardo (2001). "The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology." Cell **104**(4): 487-501.
- Lonberg, N. (2005). "Human antibodies from transgenic animals." Nat Biotechnol **23**(9): 1117-1125.
- Lutterotti, A. and R. Martin (2008). "Getting specific: monoclonal antibodies in multiple sclerosis." Lancet Neurol **7**(6): 538-547.
- Malik, N., B. W. Greenfield, A. F. Wahl and P. A. Kiener (1996). "Activation of human monocytes through CD40 induces matrix metalloproteinases." J Immunol **156**(10): 3952-3960.
- Moran, A. E., M. Kovacsovics-Bankowski and A. D. Weinberg (2013). "The TNFRs OX40, 4-1BB, and CD40 as targets for cancer immunotherapy." Curr Opin Immunol **25**(2): 230-237.
- Mulisch, M. (2013). Verfahren der Immunlokalisation, Vol. 1. Wiesbaden, Spektrum Akademischer Verlag.
- Muller, C. W., F. A. Rey, M. Sodeoka, G. L. Verdine and S. C. Harrison (1995). "Structure of the NF-kappa B p50 homodimer bound to DNA." Nature **373**(6512): 311-317.
- Oeckinghaus, A., M. S. Hayden and S. Ghosh (2011). "Crosstalk in NF-kappaB signaling pathways." Nat Immunol **12**(8): 695-708.
- Pan, G., K. O'Rourke, A. M. Chinnaiyan, R. Gentz, R. Ebner, J. Ni and V. M. Dixit (1997). "The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL." Science **276**(5309): 111-113.
- Phillips, M. L., M. H. Tao, S. L. Morrison and V. N. Schumaker (1994). "Human/mouse chimeric monoclonal antibodies with human IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4 constant domains: electron microscopic and hydrodynamic characterization." Mol Immunol **31**(15): 1201-1210.
- Radaev, S., S. Motyka, W. H. Fridman, C. Sautes-Fridman and P. D. Sun (2001). "The structure of a human type III Fc gamma receptor in complex with Fc." J Biol Chem **276**(19): 16469-16477.
- Rothe, M., S. C. Wong, W. J. Henzel and D. V. Goeddel (1994). "A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor." Cell **78**(4): 681-692.
- Roux, K. H., L. Strelets and T. E. Michaelsen (1997). "Flexibility of human IgG subclasses." J Immunol **159**(7): 3372-3382.

- Saini, S. S., B. Allore, R. M. Jacobs and A. Kaushik (1999). "Exceptionally long CDR3H region with multiple cysteine residues in functional bovine IgM antibodies." Eur J Immunol **29**(8): 2420-2426.
- Schneider, P., J. L. Bodmer, M. Thome, K. Hofmann, N. Holler and J. Tschopp (1997). "Characterization of two receptors for TRAIL." FEBS Lett **416**(3): 329-334.
- Schur, P. H. (1988). "IgG subclasses. A historical perspective." Monogr Allergy **23**: 1-11.
- Schütt, C. B. (2011). Grundwissen Immunologie, 3. Auflage. Wiesbaden, Spektrum Akademischer Verlag.
- Sedy, J., V. Bekiaris and C. F. Ware (2014). "Tumor necrosis factor superfamily in innate immunity and inflammation." Cold Spring Harb Perspect Biol **7**(4): a016279.
- Sesarman, A., G. Vidarsson and C. Sitaru (2010). "The neonatal Fc receptor as therapeutic target in IgG-mediated autoimmune diseases." Cell Mol Life Sci **67**(15): 2533-2550.
- Sheridan, J. P., S. A. Marsters, R. M. Pitti, A. Gurney, M. Skubatch, D. Baldwin, L. Ramakrishnan, C. L. Gray, K. Baker, W. I. Wood, A. D. Goddard, P. Godowski and A. Ashkenazi (1997). "Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors." Science **277**(5327): 818-821.
- Shu, U., M. Kiniwa, C. Y. Wu, C. Maliszewski, N. Vezzio, J. Hakimi, M. Gately and G. Delespesse (1995). "Activated T cells induce interleukin-12 production by monocytes via CD40-CD40 ligand interaction." Eur J Immunol **25**(4): 1125-1128.
- Siebenlist, U., G. Franzoso and K. Brown (1994). "Structure, regulation and function of NF-kappa B." Annu Rev Cell Biol **10**: 405-455.
- Siegel, R. M., J. K. Frederiksen, D. A. Zacharias, F. K. Chan, M. Johnson, D. Lynch, R. Y. Tsien and M. J. Lenardo (2000). "Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations." Science **288**(5475): 2354-2357.
- Siegmund, D., I. Lang and H. Wajant (2017). "Cell death-independent activities of the death receptors CD95, TRAILR1, and TRAILR2." Febs j **284**(8): 1131-1159.
- Silence, K., T. Dreier, M. Moshir, P. Ulrichs, S. M. Gabriels, M. Saunders, H. Wajant, P. Brouckaert, L. Huyghe, T. Van Hauwermeiren, A. Thibault and H. J. De Haard (2014). "ARGX-110, a highly potent antibody targeting CD70, eliminates tumors via both enhanced ADCC and immune checkpoint blockade." MAbs **6**(2): 523-532.
- Smith, C. A., T. Farrar and R. G. Goodwin (1994). "The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death." Cell **76**(6): 959-962.
- Solan, N. J., H. Miyoshi, E. M. Carmona, G. D. Bren and C. V. Paya (2002). "RelB cellular regulation and transcriptional activity are regulated by p100." J Biol Chem **277**(2): 1405-1418.

- Sondermann, P., R. Huber, V. Oosthuizen and U. Jacob (2000). "The 3.2-A crystal structure of the human IgG1 Fc fragment-Fc gammaRIII complex." Nature **406**(6793): 267-273.
- Stanfield, R. L. and I. A. Wilson (2014). "Antibody Structure." Microbiol Spectr **2**(2).
- Stanfield, R. L., I. A. Wilson and V. V. Smider (2016). "Conservation and diversity in the ultralong third heavy-chain complementarity-determining region of bovine antibodies." Sci Immunol **1**(1).
- Stevenson, G. T. (2014). "Three major uncertainties in the antibody therapy of cancer." Haematologica **99**(10): 1538-1546.
- Sun, S. C. (2011). "Non-canonical NF-kappaB signaling pathway." Cell Res **21**(1): 71-85.
- Tartaglia, L. A., T. M. Ayres, G. H. Wong and D. V. Goeddel (1993). "A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death." Cell **74**(5): 845-853.
- Tesselaar, K., Y. Xiao, R. Arens, G. M. van Schijndel, D. H. Schuurhuis, R. E. Mebius, J. Borst and R. A. van Lier (2003). "Expression of the murine CD27 ligand CD70 in vitro and in vivo." J Immunol **170**(1): 33-40.
- van Kooten, C. and J. Banchereau (1997). "Immune regulation by CD40-CD40-L interactions." Front Biosci **2**: d1-11.
- van Kooten, C. and J. Banchereau (2000). "CD40-CD40 ligand." J Leukoc Biol **67**(1): 2-17.
- Vidarsson, G., G. Dekkers and T. Rispiens (2014). "IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions." Front Immunol **5**: 520.
- Vonderheide, R. H. and M. J. Glennie (2013). "Agonistic CD40 antibodies and cancer therapy." Clin Cancer Res **19**(5): 1035-1043.
- Wajant, H. (2003). "Death receptors." Essays Biochem **39**: 53-71.
- Wajant, H. (2009). "The role of TNF in cancer." Results Probl Cell Differ **49**: 1-15.
- Wajant, H. (2015). "Principles of antibody-mediated TNF receptor activation." Cell Death Differ **22**(11): 1727-1741.
- Wajant, H., M. Grell and P. Scheurich (1999). "TNF receptor associated factors in cytokine signaling." Cytokine Growth Factor Rev **10**(1): 15-26.
- Waldmann, T. A. (2003). "Immunotherapy: past, present and future." Nat Med **9**(3): 269-277.
- Wang, L., F. Du and X. Wang (2008). "TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways." Cell **133**(4): 693-703.
- Wang, X., M. Mathieu and R. J. Brezski (2017). "IgG Fc engineering to modulate antibody effector functions." Protein Cell.
- Ward-Kavanagh, L. K., W. W. Lin, J. R. Sedy and C. F. Ware (2016). "The TNF Receptor Superfamily in Co-stimulating and Co-inhibitory Responses." Immunity **44**(5): 1005-1019.

Wines, B. D., M. S. Powell, P. W. Parren, N. Barnes and P. M. Hogarth (2000). "The IgG Fc contains distinct Fc receptor (FcR) binding sites: the leukocyte receptors Fc gamma RI and Fc gamma RIIa bind to a region in the Fc distinct from that recognized by neonatal FcR and protein A." J Immunol **164**(10): 5313-5318.

Ye, S., M. I. Fox, N. A. Belmar, M. Sho, D. T. Chao, D. Choi, Y. Fang, V. Zhao, S. F. Keller, G. C. Starling and P. A. Culp (2017). "Enavatuzumab, a Humanized Anti-TWEAK Receptor Monoclonal Antibody, Exerts Antitumor Activity through Attracting and Activating Innate Immune Effector Cells." J Immunol Res **2017**: 5737159.

Zhou, Z., Y. Tone, X. Song, K. Furuuchi, J. D. Lear, H. Waldmann, M. Tone, M. I. Greene and R. Murali (2008). "Structural basis for ligand-mediated mouse GITR activation." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(2): 641-645.

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematischer Aufbau von IgG Antikörpern	3
Abbildung 2:	Schematische Darstellung der TNFRSF Todesrezeptoren	9
Abbildung 3:	Schematische Darstellung der TRAF-interagierenden TNFRSF-Rezeptoren	11
Abbildung 4:	Schematische Darstellung der Aktivierung von Rezeptoren der TNFR-Superfamilie durch deren Liganden	14
Abbildung 5:	Schematische Darstellung der Aktivierung von Rezeptoren der TNFRSF durch spezifische Antikörper	16
Abbildung 6:	Klassischer und alternativer NFκB-Signalweg	20
Abbildung 7:	Negativbild der Western Blot Analyse der produzierten Antikörper	39
Abbildung 8:	Schematischer Aufbau der produzierten Antikörper	40
Abbildung 9:	Agonistische Aktivität der anti-CD40 (bzw anti-Fas)-Antikörper-Fusionsproteine auf HT1080-CD40 (bzw. HT1080) Zellen nach Stimulation mit HEK 293 Ko-Kulturellen, in die CD70 bzw. ein Leervektor transfiziert wurde	42
Abbildung 10:	Agonistische Aktivität der anti-CD40 (bzw anti-Fas)-Antikörper-Fusionsproteine auf HT1080-CD40 (bzw. HT1080) Zellen nach Stimulation mit CD70-positiven B2AB Zellen und CD70-negativen Jurkat Zellen als Kontrolle	44
Abbildung 11:	Agonistische Aktivität der anti-CD40 (bzw anti-Fas)-Antikörper-Fusionsproteine auf HT1080-CD40 (bzw. HT1080) Zellen nach Stimulation mit Ko-Kulturzellen	46

Abbildung 12:	Vitalitätsbestimmung von HT1080 Zellen nach Inkubation mit und ohne ZVAD	47
Abbildung 13:	Gegenüberstellung der agonistischen Aktivität des anti-Fas-Fab ₂ Antikörpers mit scFv:CD70 an verschiedenen Stellen anhand von IL-8 Elisa und Kritallviolett-Toxizitätsassays	49
Abbildung 14:	Silberfärbung zur quantitativen und qualitativen Analyse der aufgereinigten Antikörper-Fusionsproteine.	51
Abbildung 15:	Gegenüberstellung der agonistischen Aktivität der Fab ₂ -Konstrukte vor und nach der Aufreinigung über den FLAG-Tag	52
Abbildung 16:	Affinitätsbestimmung der Fab ₂ -Konstrukte an CD70 der verschiedenen Zelllinien	53
Abbildung 17:	Gegenüberstellung der agonistischen Aktivität der Fab ₂ -Konstrukte anti-CD40-Fab ₂ -CH:scFv:CD70 und anti-Fas-Fab ₂ -CH:scFv:CD70 auf HT1080 bzw. HT1080-CD40 Zellen in Ko-Kultur mit verschiedenen Suspensionszellen	55

9. Anhang

9.1 DNA-Sequenzen

anti-CD40(h)-Flag-HC-heavy-full-scFc-anti-CD70(9G2)-pCR3 (hIgG1)

```

1  GAGCTCTCTGGCTNN CTAGAGAACCCACTG CTTACTGGCTTATCG AAATTAATACGACTC
1  E L S G X L E N P L L T G L S K L I R L
61  ACTATAGGGGAGACCC AAGCTTCAAAACATG AACTTCGGCTTCAGC CTGATCTTCCTGGTG
21  T I G R P K L Q N M N F G F S L I F L V
121  CTGGTGTCTGAAGGGC GTGCAGTGCGAAGTG AAGCTGGTGCCTCCGG CAATTGGACTACAAG
41  L V L K G V Q C E V K L V P R Q L D Y K
181  GACGACGACGACAAA GAATTGGATATCCAG CTCCAGCAGTCTGGC CCTGGACTCGTCAAA
61  D D D D K E L D I Q L Q Q S G P G L V K
241  CCATCTCAGAGCCTG TCTCTCACCTGTTCT GTCACCGGATACTCC ATCACCACCAACTAC
81  P S Q S L S L T C S V T G Y S I T T N Y
301  AACTGGAATTGGATT CGGCAGTTTCCTGGG AACAAACTCGAATGG ATGGGATACATCCGA
101  N W N W I R Q F P G N K L E W M G Y I R
361  TACGACGGCACTAGT GAATACACCCCATCT CTCAAAAATCGGGTG TCCATTACCCGGGAC
121  Y D G T S E Y T P S L K N R V S I T R D
421  ACTTCTATGAACCAG TTCTTTCTCCGACTC ACCTCTGTGACACCT GAGGATACCCGCACA
141  T S M N Q F F L R L T S V T P E D T A T
481  TACTACTGTCTAGA CTGGACTACTGGGGG CAGGGAACACTGGTG ACCGTGTCATCTGGA
161  Y Y C A R L D Y W G Q G T L V T V S S G
541  TCCTCTAGCGCCAGC ACAAAGGGCCCCAGC GTGTTCCCTCTGGCC CCTAGCAGCAAGAGC
181  S S S A S T K G P S V F P L A P S S K S
601  ACATCTGGCGGAACA GCCGCCCTGGGCTGC CTCGTGAAGGACTAC TTTCCCGAGCCCGTG
201  T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V
661  ACAGTGTCTGGAAC TCTGGCGCCCTGACA AGCGGCGTGCACACC TTTCCAGCCGTGCTG
221  T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L
721  CAGAGCAGCGCCTG TACTCTGTGAGCAGC GTCGTGACTGTGCC AGCAGCAGCTGGGC
241  Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G
781  ACCCAGACCTACATC TGCAACGTGAACCAC AAGCCCAGCAACACC AAGGTGGACAAGAAG
261  T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K
841  GTGGAACCCAAAGAG TGCGACAAGACCCAC ACCTGTCCCCCTTGT CCTGCCCTGAACTG
281  V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L
901  CTGGGCGGACCTTCC GTGTTCTGTGTTCCC CCAAAGCCCAAGGAC ACCCTGATGATCAGC
301  L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S
961  CGGACCCCCGAAGTG ACCTGCGTGGTNGNT GGATGTGTCCCACGA GGACCTGAAGTGAA
321  R T P E V T C V V X G C V P R G P * S E
1021  GTTTAATTGGTACGT GNCCGGCGTGGAAGT GCACAACGCCAAGAC CAAGCCCAGAAA
341  V * L V R X R R G S A Q R Q D Q A Q K

```

anti-CD40(h)-Flag-HC-heavy-full-scFc-anti-CD70(9G2)-pCR3 (N297A)

```

1  GAGCTCTCTGGCTAN CTAGAGAACCCACTG CTTACTGGCTTATCG AAATTAATACGACTC
1  E L S G X L E N P L L T G L S K L I R L
61  ACTATAGGGGAGACCC AAGCTTCAAAACATG AACTTCGGCTTCAGC CTGATCTTCCTGGTG
21  T I G R P K L Q N M N F G F S L I F L V
121  CTGGTGTCTGAAGGGC GTGCAGTGCGAAGTG AAGCTGGTGCCTCCGG CAATTGGACTACAAG
41  L V L K G V Q C E V K L V P R Q L D Y K
181  GACGACGACGACAAA GAATTGGATATCCAG CTCCAGCAGTCTGGC CCTGGACTCGTCAAA
61  D D D D K E L D I Q L Q Q S G P G L V K
241  CCATCTCAGAGCCTG TCTCTCACCTGTTCT GTCACCGGATACTCC ATCACCACCAACTAC
81  P S Q S L S L T C S V T G Y S I T T N Y
301  AACTGGAATTGGATT CGGCAGTTTCCTGGG AACAAACTCGAATGG ATGGGATACATCCGA

```

101 N W N W I R Q F P G N K L E W M G Y I R
 361 TACGACGGCACTAGT GAATACACCCCATCT CTCAAAAATCGGGTG TCCATTACCCGGGGAC
 121 Y D G T S E Y T P S L K N R V S I T R D
 421 ACTTCTATGAACCAG TTCTTTCTCCGACTC ACCTCTGTGACACCT GAGGATACCCGCCACA
 141 T S M N Q F F L R L T S V T P E D T A T
 481 TACTACTGTGCTAGA CTGGACTACTGGGGG CAGGGAACACTGGTG ACCGTGTCATCTGGA
 161 Y Y C A R L D Y W G Q G T L V T V S S G
 541 TCCAGCAGCGCCTCT ACAAAGGGCCCCAGC GTGTTCCCTCTGGCC CCTAGCAGCAAGAGC
 181 S S S A S T K G P S V F P L A P S S K S
 601 ACATCTGGCGGAACA GCCGCCCTGGGCTGC CTCGTGAAGGACTAC TTTCCCGAGCCCGTG
 201 T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V
 661 ACCGTGTCCTGGAAC TCTGGCGCTCTGACA AGCGGCGTGCACACC TTTCCAGCCGTGCTG
 221 T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L
 721 CAGAGCAGCGCCTG TACTCTCTGAGCAGC GTCGTGACAGTGCC AGCAGCTCTCTGGGC
 241 Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G
 781 ACCCAGCTACATC TGCAACGTGAACCAC AAGCCAGCAACACC AAGGTGGACAAGAAG
 261 T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K
 841 GTGGAACCCAAGAGC TGCACAAAGACCCAC ACCTGTCCCCCTTGT CCTGCCCCCGAACTG
 281 V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L
 901 CTGGGAGGCCCTTCC GTGTTCCTGTTCCCC CCAAAGCCCAAGGAC ACCCTGATGATCAGC
 301 L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S
 961 CGGACCCCGAAGTG ACCTGCGTGGNNGGT GGATGTGTCCCAGCA NGGACCTGAAANNG
 321 R T P E V T C V X G G C V P R X T L K X
 1021 AAGTTTAATTTGGTA CGTGGNNNGCGTGG AAANTGCACAACGCC CAAGACCAAGCCTAN
 341 K F N L V R G X A W K X H N A Q D Q A X
 1081 AANAGGAACAGTACG CCCAGCACC
 361 X R N S T P S T

anti-CD40-Flag-HC-Fab₂-scFv:CD70(9G2)-pCR3

1 AGCAGAGCTCTCTGG CTANCTAGAGAACCN ACTGCTTACTGGCTT ATCGAAATTAATACG
 1 S R A L W L X R E P T A Y W L I E I N T
 61 ACTCACTATAGGGAG ACCCAAGCTTCAAAA CATGAACTTCGGCTT CAGCCTGATCTTCCT
 21 T H Y R E T Q A S K H E L R L Q P D L P
 121 GGTGCTGGTGTGAA GGGCGTGCAGTGCGA AGTGAAGCTGGTGCC CCGGCAATTGGACTA
 41 G A G A E G R A V R S E A G A P A I G L
 181 CAAGGACGACGACGA CAAAGAATTGGATAT CCAGCTCCAGCAGTC TGGCCCTGGACTCGT
 61 Q G R R R Q R I G Y P A P A V W P W T R
 241 CAAACCATCTCAGAG CCTGTCTCTCACCTG TTCTGTACCAGGATA CTCCATCACCACCAA
 81 Q T I S E P V S H L F C H R I L H H H Q
 301 CTACAACTGGAATTG GATTCGGCAGTTTCC TGGGAACAAACTCGA ATGGATGGGATACAT
 101 L Q L E L D S A V S W E Q T R M D G I H
 361 CCGATCAGACGGCAC TAGTGAATACACCC ATCTCTCAAAAATCG GGTGTCCATTACCCG
 121 P I R R H * * I H P I S Q K S G V H Y P
 421 GGACACTTCTATGAA CCAGTTCTTTCTCCG ACTCACCTCTGTGAC ACCTGAGGATACCCG
 141 G H F Y E P V L S P T H L C D T * G Y R
 481 CACATACTACTGTGC TAGACTGGACTACTG GGGCAGGGAACACT GGTGACCGTGTCTATC
 161 H I L L C * T G L L G A G N T G D R V I
 541 TGGATCCTTAGCGC CAGCACAAGGGCCC CAGCGTGTTCCTCT GGCCTTAGCAGCAA
 181 W I L * R Q H K G P Q R V P S G P * Q Q
 601 GAGCACATCTGGCGG AACAGCCGCCCTGGG CTGCCTCGTGAAGGA CTACTTTCCCGAGCC
 201 E H I W R N S R P G L P R E G L L S R A
 661 CGTGACAGTGTCTG GAACTCTGGCGCCCT GACAAGCGGCGTGCA CACCTTCCAGCCGT
 221 R D S V L E L W R P D K R R A H L S S R
 721 GCTGCAGACGCGC CCTGTACTCTCTGAG CAGCGTCTGACTGT GCCCAGCAGACCT
 241 A A E Q R P V L S E Q R R D C A Q Q Q P
 781 GGGACCCAGACCTA CATCTGCAACGTGAA CCACAAGCCAGCAA CACCAAGGTGGACAA
 261 G H P D L H L Q R E P Q A Q Q H Q G G Q
 841 GAAGGTGGAACCCAA GAGCTGCGACAAGC CCACACCTGTCCNN TTGTCTGCCCTCGA
 281 E G G T Q E L R Q D P H L S X L S C P R
 901 GCAGGTGCAGCTGNT GGGAACTGTGGNNGCG GACTGATGCANCTG GCCGGCTCTTGAGA
 301 A G A A X G N L X A D * C X L A G S L R
 961 CTG

321 L

anti-Fas(E09)-Flag-HC-heavy-full-scFv:CD70(9G2)-pCR3 (hlgG1)

```

1 CTCTCTGGCTANCTA GAGAACCCACTGCTT ACTGGCTTATCGAAA TTAATACGACTCACT
1 L S G X L E N P L L T G L S K L I R L T
61 ATAGGGAGACCCAAG CTTCAAAACATGAAC TTCGGCTTCAGCCTG ATCTTCTCGGTGCTG
21 I G R P K L Q N M N F G F S L I F L V L
121 GTGCTGAAGGGCGTG CAGTGCGAAGTGAAG CTGGTGCCCCGCAA TTGGACTACAAGGAC
41 V L K G V Q C E V K L V P R Q L D Y K D
181 GACGACGACAAAGAA TTCCAGCTGCAGCTG CAGGAATCTGGCCCT GGCCTCGTGAAGCCC
61 D D D K E F Q L Q L Q E S G P G L V K P
241 AGCGAGACACTGAGC CTGACCTGTACCGTG TCCGGCGCCAGCATC AGCGCCAACAGCTAC
81 S E T L S L T C T V S G A S I S A N S Y
301 TATGGCGTGTGGGTG CGCCAGAGCCCTGGC AAGGACTGGAATGG GTGGGATCTATCGCC
101 Y G V W V R Q S P G K G L E W V G S I A
361 TACCGGGGCAACAGC AACAGCGGCAGCACC TACTACAACCCAGC CTGAAGTCCCAGGCC
121 Y R G N S N S G S T Y Y N P S L K S R A
421 ACCGTGTCTGTGGAC ACCAGCAAGAACCAG GTGTCCCTGCGGCTG ACCTCTGTGACAGCC
141 T V S V D T S K N Q V S L R L T S V T A
481 GCCGATACCCCTG TACTACTGCGCCAGA AGGCAGCTGCTGGAC GACGGCACAGATAT
161 A D T A L Y Y C A R R Q L L D D G T G Y
541 CAGTGGGCCGCTTC GATGTGTGGGGCCAG GGAACAATGGTCACC GTGTCTCCAGATCC
181 Q W A A F D V W G Q G T M V T V S S R S
601 TCTAGCGCCAGCACA AAGGGCCCCAGCGTG TTCCTCTGGCCCT AGCAGCAAGAGCACA
201 S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T
661 TCTGGCGGAACAGCC GCCCTGGGCTGCCTC GTGAAGGACTACTTT CCCGAGCCCGTGACA
221 S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T
721 GTGTCTGGAACCTCT GGCGCCCTGACAAGC GCGTGCACACCTTT CCAGCCGTGCTGCAG
241 V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q
781 AGCAGCGGCCTGTAC TCTCTGAGCAGCGTC GTGACTGTGCCAGC AGCAGCCTGGGCACC
261 S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T
841 CAGACCTACATCTGC AACGTGAACCACAAG CCCAGCAACACCAAG GTGGACAAGAAGGTG
281 Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V
901 GAACCCAAGAGCTGC GACAAGACCCACACC TGTCCCCCTTGCTCT GCCCTGAACTGCTG
301 E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L
961 GCGGACCTTCCGTG TTCCTGTTCCCCCCA AAGCCCAAGGACACC CTGATGATCAGCCGG
321 G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R
1021 ACCCCCGAAGTGACC TGCGTGGTGGTGGAT GTGTCCCACGAGGAC CCTGAAGTGAAGTTT
341 T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F
1081 AATTGGTACGTGGAC GGNNGGAAGTGCAC AACGCCAAGACCAAG CCCANANNAGGAANN
361 N W Y V D G X E V H N A K T K P X X G X
1141 GTACAACAGCCCNNT ACCGGG
381 V Q Q P X T G

```

anti-Fas(E09)-Flag-heavy-konst-scFv:CD70(9G2)-pCR3 (N297A)

```

1 AGCAGAGCTCTCTGG CTNNCTAGAGAACCC ACTGCTTACTGGCTT ATCGAAATTAATACG
1 S R A L W L X R E P T A Y W L I E I N T
61 ACTCACTATAGGGAG ACCCAAGCTTCAAAA CATGAACCTCGGCTT CAGCCTGATCTTCTT
21 T H Y R E T Q A S K H E L R L Q P D L P
121 GGTGCTGGTGCTGAA GGGCGTGCAGTGCGA AGTGAAGCTGGTGCC CCGGCAATTGGACTA
41 G A G A E G R A V R S E A G A P A I G L
181 CAAGGACGACGACGA CAAAGAATTGCAGCT GCAGCTGCAGGAATC TGGCCCTGGCCTCGT
61 Q G R R R Q R I A A A A A G I W P W P R
241 GAAGCCCAGCGAGAC ACTGAGCCTGACCTG TACCGTGTCCGGCGC CAGCATCAGCGCCAA
81 E A Q R D T E P D L Y R V R R Q H Q R Q
301 CAGCTACTATGGCGT GTGGGTGCGCCAGAG CCCTGGCAAGGGACT GGAATGGGTGGGATC

```

101 Q L L W R V G A P E P W Q G T G M G G I
 361 TATCGCCTACCGGG CAACAGCAACAGCG CAGCACCTACTACAA CCCAGCCTGAAGTC
 121 Y R L P G Q Q Q Q R Q H L L Q P Q P E V
 421 CCGGGCCACCGTGT TGTGGACACCAGCAA GAACCAGGTGTCCCT GCGGCTGACCTCTGT
 141 P G H R V C G H Q Q E P G V P A A D L C
 481 GACAGCCGCCGATAC CGCCTGTACTACTG CGCCAGAAGGCAGCT GCTGGACGACGGCAC
 161 D S R R Y R P V L L R Q K A A A G R R H
 541 AGGATATCAGTGGG CGCCTTCGATGTGT GGGCCAGGGAACAAT GGTACCGTGTCCCT
 181 R I S V G R L R C V G P G N N G H R V L
 601 CGGATCCAGCAGCG CTCTACAAAGGGCC CAGCGTGTCCCTCT GGCCCTAGCAGCAA
 201 R I Q Q R L Y K G P Q R V P S G P * Q Q
 661 GAGCACATCTGGCG AACAGCCGCCCTGGG CTGCCTCGTGAAGGA CTACTTTCCCGAGCC
 221 E H I W R N S R P G L P R E G L L S R A
 721 CGTGACCGTGTCTG GAANNTCTGGCGCTC TGACAAGCGCGTGC ACACCTTTCCAGCCG
 241 R D R V L E X L A L * Q A A C T P F Q P
 781 TGCTGCAGAGCAGG GCCTGTACTCTGTA NCAGCGTGTGACAG TGCCAGCAGCTCTC
 261 C C R A A A C T L * X A S * Q C P A A L
 841 TGGGCACCCAGACCT ACATCTGCAACGTGA ACCACAAGCCAGCA ACACCAAGGTGGACA
 281 W A P R P T S A T * T T S P A T P R W T
 901 AGAANG
 301 R X

anti-Fas(E09)-Flag-HC-Fab₂-scFv:CD70(9G2)-pCR3

1 TAGCAGAGCTCTCTG GCTANCTAGAGAACC CACTGCTTACTGGCT TATCGAAATTAATAC
 1 * Q S S L A X * R T H C L L A Y R N * Y
 61 GACTCACTATAGGGA GACCCAAGCTTCAAA ACATGAACTTCGGCT TCAGCCTGATCTTCC
 21 D S L * G D P S F K T * T S A S A * S S
 121 TGGTGCTGGTGCTGA AGGGCGTGCAGTGC AAGTGAAGCTGGTGC CCCGGCAATTGGACT
 41 W C W C * R A C S A K * S W C P G N W T
 181 ACAAGGACGACGACG ACAAAGAATTGCAGC TGCAGCTGCAGGAAT CTGGCCCTGGCCCTCG
 61 T R T T T T K N C S C S C R N L A L A S
 241 TGAAGCCCAGCGAGA CACTGAGCCTGACCT GTACCGTGTCCGGCG CCAGCATCAGCGCCA
 81 * S P A R H * A * P V P C P A P A S A P
 301 ACAGTACTATAGGCG TGTGGGTGCGCCAGA GCCCTGGCAAGGGAC TGGAATGGGTGGGAT
 101 T A T M A C G C A R A L A R D W N G W D
 361 CTATCGCCTACCGGG GCAACAGCAACAGCG GCAGCACCTACTACA ACCCAGCCTGAAGT
 121 L S P T G A T A T A A A P T T T P A * S
 421 CCCGGCCACCGTGT CTGTGGACACCAGCA AGAACCAGGTGTCCC TGCGGCTGACCTCTG
 141 P G P P C L W T P A R T R C P C G * P L
 481 TGACAGCCGCCGATA CCGCCTGTACTACT GCGCCAGAAGGCAGC TGCTGGACGACGGCA
 161 * Q P P I P P C T T A P E G S C W T T A
 541 CAGGATATCAGTGGG CCGCCTTCGATGTGT GGGCCAGGGAACAAT TGGTACCGTGTCCCT
 181 Q D I S G P P S M C G A R E Q W S P C P
 601 CCGGATCTCTAGCG CCAGCACAAAGGGCC CCAGCGTGTCCCTC TGGCCCTAGCAGCA
 201 P D P L A P A Q R A P A C S L W P L A A
 661 AGAGCACATCTGGCG GAACAGCCGCCCTGG GCTGCCTCGTGAAGG ACTACTTTCCCGAGC
 221 R A H L A E Q P P W A A S * R T T F P S
 721 CCGTGACAGTGTCTT GGAActCTGGCGCCC TGACAAGCGCGTGC ACACCTTTCCAGCCG
 241 P * Q C P G T L A P * Q A A C T P F Q P
 781 TGCTGCAGAGCAGCG GCCTGTACTCTGTA GCAGCGTGTGACTG TGCCAGCAGCTCTC
 261 C C R A A A C T L * A A S * L C P A A A
 841 TGGGCACCCAGACCT ACATCTGCAACGTGA ACCACAAGCCAGCA ACACCAAGGTGGACA
 281 W A P R P T S A T * T T S P A T P R W T
 901 AGAAGGTGGAACCCA AGAGCTGCNACAAGA CCCACACCTGTCCCC CCTGTCTGCCCCCT
 301 R R W N P R A A T R P T P V P P C P A L
 961 GAGCAGGTGCAGCTG GGNGNAATCTGGCCG CCGAAC
 321 E Q V Q L G X I W P P N

9.2 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Alanin
A	Ampere
APC	antigen-presenting cell
c	centi
ca	circa
Caspase	cysteinyl aspartat specific proteinase
CD	cluster of Differentiation
CD27	T-cell activating antigen S152
CD40	Cluster of differentiation 40-receptor
CD95	TNFRSF6, apoptosis-mediating surface antigen Fas
CH, CL	immunoglobulin constant region (heavy or light chain)
CHX	Cycloheximid
cIAP	<i>inhibitor of apoptosis</i>
CIAP	calf intestine alkaline phosphatase
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRD	cysteine-rich domain
Da	Dalton
DcR	decoy receptor
DD	death domain
DISC	death-inducing signaling complex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DR	death receptor
E.coli	Escherichia coli
EDAR	ectodysplasin A receptor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
etc.	et cetera
Fab	fragment antigen binding
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FADD	Fas-associated death domain
Fc	fragment crystallisable
FCS	fetales Kälberserum
FcγR	Fc-Gamma-Rezeptor
FLAG	Polypeptid Protein-Tag (DYKDDDDK)
g	Gramm
GpL	Gaussia princeps Luziferase
h	Stunde(n)
h	human
HCl	Chlorwasserstoff; Salzsäure
HRP	horse radish peroxidase
Ig	Immunglobulin
IKK	<i>IκB kinase</i>
IL	Interleukin
IκB	inhibitor of nuclear factor ,kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
k	Kilo
Kd	Dissoziationskonstante
L	Leucin
l	Liter
LB	Bakterienkulturmedium, Luria Bertani
LPS	Lipopolysaccharid
m	milli
M	Molarität (Mol/Liter)
M2	anti-FLAG mAB

min	Minuten
MMP	matrix metalloproteinase
mol	Stoffmenge
N	Asparagin
n	nano
NEMO	NF κ B essential modulator
NF κ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NIK	<i>NFκB-inducing kinase</i>
NLS	nuclear localization signal
nm	nanometer
p50	NF κ B1, Untereinheit p50
p52	NF κ B2, Untereinheit p52
p65	NF κ B1, Untereinheit p62
p75NGFR	p75-nerve.growth factor receptor
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PLAD	pre-ligand assembly domain
RANK	Receptor activator of nuclear factor kappa-B
RHR	Rel homology region
RIP	receptor-interacting protein
RNA	ribonucleic acid
rpm	Rounds per minute
sc	Single chain
scFv	single chain variable fragment
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel
Tab.	Tabelle
TAB1	<i>TAK1-binding-protein</i>
TAK	<i>TGFβ-activated kinase</i>

TBS	tris buffered saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
THD	TNF homology domain
TNC	Tenascin-C
TNF	tumor necrosis factor
TNFR	tumor necrosis factor receptor
TNFRSF	Tumor necrosisfactor receptor superfamily
TNFSF	tumor necrosis factor superfamily
TRAF	TNFR associated factor
TRAIL	tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand
TRAILR	tumor necrose faktor-related apoptosis-inducing-ligand-receptor
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
UV	ultra-violett
V	Volt
VH, VL	immunoglobulin variable region (heavy or light chain)
w/o	without leader
XEDAR	X-linked ectodysplasin-A2 receptor
zVAD-fmk	N-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethyl-ke-ton
β	beta
γ	gamma
μ	mikro

Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei Prof. Dr. Wajant bedanken, dass ich unter seiner Betreuung in der Abteilung der molekularen inneren Medizin forschen und meine Dissertation verfassen durfte. Die stets für Nachfragen offen stehende Bürotür war für das erfolgreiche Arbeiten eine große Hilfe.

Des Weiteren gilt mein Dank allen Mitarbeitern der Abteilung. Ein super Arbeitsklima und lockere Atmosphäre beim Pipettieren und auch beim Kaffee haben die Zeit wie im Flug vergehen lassen. Insbesondere möchte ich mich hier bei Dani III und meinem stets zur Seite stehenden Betreuer Johannes bedanken, da sie mit mir den größten Aufwand hatten.

Natürlich wird an dieser Stelle auch ein großes Dankeschön an meine Eltern nicht vergessen, die mich während der Studiums- und Promotionszeit unermüdlich unterstützten.