

Herstellung eines anti-PD-1-Gelolin-Konjugats zum Einsatz in der Transplantationsmedizin

Vom Fachbereich Chemie der Technischen Universität Kaiserslautern
zur Verleihung des akademischen Grades
“Doktor der Naturwissenschaften“
genehmigte

DISSERTATION

(D 386)

vorgelegt von

Dipl.-Chem. Jessica Becker

Betreuer: Prof. Dr. Wolfgang E. Trommer

Wissenschaftliche Aussprache:

23. Mai 2013

Für meine Familie

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von März 2009 bis April 2013 im Fachbereich Chemie der Technischen Universität Kaiserslautern in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. W. Trommer und von März 2012 bis Mai 2012 am Institut für Biomedizin in León (Spanien) in der Arbeitsgruppe von Dr. J.-I. Rodriguez-Barbosa.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Wolfgang E. Trommer für die Überlassung dieses sehr interessanten Themas und für die Unterstützung bei der Durchführung.

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 23. Mai 2013

Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. H. Sitzmann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. E. Trommer

2. Berichterstatter: PD Dr. G. Klock

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	IX
Verwendete Abkürzungen	X
1. Einleitung	1
1.1 Das Immunsystem	1
1.1.1 Die Lymphozyten	2
1.1.1.1 Die T-Lymphozyten	2
1.1.1.2 Die B-Lymphozyten	4
1.1.2 Immunglobuline	6
1.1.2.1 Monoklonale Antikörper und ihre Anwendung	8
1.1.2.2 Herstellung monoklonaler Antikörper	9
1.2 Immunotoxine	11
1.2.1 Die Ligandenkomponente	13
1.2.1.1 Transplantation	13
1.2.1.2 PD-1/PD-L1-Signalweg	15
1.2.2 Die Toxinkomponente	16
1.2.2.1 Ribosomen-inaktivierende Proteine	16
1.2.2.2 Gelonin	17
1.3 Kopplungsreaktionen	18
2. Problemstellung	21
3. Eigene Ergebnisse und Diskussion	23
3.1 Herstellung, Aufreinigung, Charakterisierung und Untersuchungen zur Wirkung des anti-PD-1-Gelonin-Konjugats	23
3.1.1 Isolierung der Proteinkomponenten	23
3.1.1.1 Isolierung und Charakterisierung von Gelonin aus den Samen von <i>Gelonium multiflorum</i>	24
3.1.1.2 Isolierung von rekombinantem Gelonin aus <i>E. coli</i>	25
3.1.1.3 Isolierung des anti-PD-1-Antikörpers	30
3.1.2 Herstellung des anti-PD-1-Gelonin-Konjugats mit natürlichem Gelonin	33
3.1.2.1 Modifizierung mit 2-Iminothiolan	33
3.1.2.2 Einführung der Maleimidgruppen in nGel	38
3.1.2.3 Kopplung zwischen natürlichem Gelonin und dem anti-PD-1-Antikörper	40
3.1.2.4 Aufreinigung des anti-PD-1-Gelonin-Konjugats mittels HPLC	41

3.1.2.5	Diskussion.....	42
3.1.3	Herstellung des anti-PD-1-Gelonin-Konjugats mit rekombinantem Gelonin....	43
3.1.3.1	Modifizierung von rekombinantem Gelonin und dem anti-PD-1-Antikörper mit 2-Iminoethanol.....	44
3.1.3.2	Einführung der Maleimidgruppen in rGel.....	45
3.1.3.3	Kopplung zwischen rekombinantem Gelonin und dem anti-PD-1-Antikörper.....	46
3.1.3.4	Aufreinigung des anti-PD-1-Gelonin-Konjugats mittels HPLC	47
3.1.3.5	Diskussion.....	48
3.1.4	Steigerung der Konjugatkonzentration und Verbesserung der Aufreinigung	49
3.1.4.1	Aufreinigung des Konjugats mittels ÄKTA	51
3.1.4.2	Aufreinigung des Konjugats mittels Nickelaffinitätschromatographie.....	53
3.1.4.3	Immunologischer Nachweis des anti-PD-1-Gelonin-Konjugats.....	55
3.1.4.4	Diskussion.....	57
3.1.5	Untersuchungen zur Wirkung des anti-PD-1-Gelonin-Konjugats	58
3.1.5.1	Überprüfung der Bindungsaffinität des anti-PD-1-Antikörpers nach der Kopplungsreaktion.....	58
3.1.5.2	Untersuchungen zur Wirkung des Konjugats <i>in vitro</i>	63
3.1.5.3	Überprüfung der Toxizität des Konjugats mittels des <i>in-vitro</i> -Translationsassays ...	64
3.1.5.4	Diskussion.....	66
3.2	Herstellung und Charakterisierung eines monoklonalen anti-Gelonin-Antikörpers	67
3.2.1	Immunisierung von BALB/c Mäusen	67
3.2.2	Zellfusion	70
3.2.3	Klonierung positiver Hybridome	72
3.2.4	Antikörperproduktion.....	73
3.2.4.1	Antikörperproduktion <i>in vitro</i>	73
3.2.4.2	Antikörperproduktion <i>in vivo</i>	74
3.2.5	Isotypisierung des Antikörpers.....	75
3.2.6	Isolierung und Aufreinigung des Antikörpers mittels Protein-G-Affinitätschromatographie.....	76
3.2.6.1	Isolierung aus dem Zellkulturüberstand.....	77
3.2.6.2	Isolierung aus der Aszitesflüssigkeit.....	81
3.2.7	Bestimmung des Antikörpertiters.....	82
3.2.8	Bestimmung der Kreuzreaktivität	83
3.2.9	Diskussion	84

4. Zusammenfassung	86
5. Experimenteller Teil	89
5.1 Materialien	89
5.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	89
5.1.2 Chemikalien	91
5.1.3 Zellkulturmaterialien, Medien und Reagenzien	93
5.1.3.1 Medien und Reagenzien.....	93
5.1.3.2 Materialien	93
5.1.4 Proteinmarker	94
5.1.5 Säulen und Säulenmaterialien	94
5.1.6 <i>E. coli</i> -Stämme und Plasmide	95
5.1.7 Proteine und Enzyme	95
5.1.8 Zelllinien	95
5.1.9 Antikörper	96
5.1.10 Puffer und Lösungen	96
5.1.11 Sonstige Materialien.....	96
5.2 Allgemeine Arbeitsmethoden	97
5.2.1 Konzentrationsbestimmungen	97
5.2.1.1 UV-Vis-Spektroskopie.....	97
5.2.1.2 BCA-Test	98
5.2.1.3 Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA Lösungen.....	98
5.2.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	98
5.2.2.1 Coomassie-Färbung des Gels.....	100
5.2.2.2 Molekulargewichtsbestimmung	100
5.2.3 Dialyse.....	100
5.2.4 Proteinkonzentration	101
5.2.4.1 Aufkonzentration mit Konzentratoren	101
5.2.4.2 TCA-Fällung	101
5.2.5 Silanisierung von Glasgefäßen	102
5.2.6 Chromatographische Methoden	102
5.2.6.1 Affinitätschromatographie	102
5.2.6.2 Ionenaustauschchromatographie.....	102
5.2.6.3 Gelfiltrationschromatographie	103
5.2.6.4 HPLC	103

5.2.6.5	ÄKTA	103
5.3	Zellbiologische Arbeitsmethoden	104
5.3.1	Hitzeinaktivierung von fetalem Kälberserum	104
5.3.2	Einfrieren und Lagern von Zellen	104
5.3.3	Auftauen von Zellen	104
5.3.4	Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer	104
5.3.5	Kultivierung und Abernten von Zellen	105
5.3.5.1	Kultivierung und Abernten von adhärennten Zellkulturen	105
5.3.5.2	Kultivierung und Abernten von Suspensionskulturen	106
5.3.6	Transfektion	106
5.4	Immunologische Arbeitsmethoden	107
5.4.1	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	107
5.4.2	Western-Blot	107
5.4.3	Fluorescence-activated cell sorting (FACS) und Durchflusszytometrie	109
5.4.3.1	Bestimmung der Bindungsaffinität mittels Durchflusszytometrie	110
5.4.3.2	Bestimmung der Mortalität mittels Durchflusszytometrie	110
5.5	Spezielle Arbeitsmethoden	111
5.5.1	Isolierung von Gelonin aus dem Samen von <i>Gelonium multiflorum</i>	111
5.5.2	Isolierung von rekombinantem Gelonin aus <i>E. coli</i>	112
5.5.2.1	Kulturmedien	112
5.5.2.2	Herstellung kompetenter Zellen	113
5.5.2.3	Transformation und Kompetenztest	113
5.5.2.4	Plasmidisolierung	113
5.5.2.5	Glycerinkulturen	113
5.5.2.6	Kulturbedingungen	114
5.5.2.7	Wachstumsmessungen	114
5.5.2.8	Expression	114
5.5.2.9	Zellyse	114
5.5.2.10	Isolierung von His ₆ ^T -Gelonin ₁₋₂₅₁ mittels Nickelaффinitätschromatographie	115
5.5.2.11	Abspaltung des His-Tags von His ₆ ^T -Gelonin ₁₋₂₅₁	117
5.5.3	Isolierung des anti-PD-1-Antikörpers	117
5.5.4	Herstellung des anti-PD-1-Gelonin-Konjugats	118
5.5.4.1	Modifizierung mit 2-Iminothiolan	118
5.5.4.2	Einbaubestimmung von Thiolgruppen	119

5.5.4.3	Einführung von Maleimidgruppen.....	120
5.5.4.4	Einbaubestimmung von Maleimidgruppen.....	121
5.5.4.5	Kopplung der modifizierten Proteine.....	121
5.5.4.6	Aufreinigung des Konjugats	122
5.5.5	Herstellung des monoklonalen anti-Gelonin-Antikörpers	123
5.5.5.1	Immunisierung von BALB/c Mäusen	124
5.5.5.2	Entnahme einer Blutprobe bei der Maus.....	124
5.5.5.3	Präparation der Milzzellen	125
5.5.5.4	Zellfusion	125
5.5.5.5	Nachweis positiver Hybridome.....	127
5.5.5.6	Klonierung positiver Hybridome	127
5.5.5.7	Expansion positiver Klone und Produktion des Antikörpers	128
5.5.5.8	Isotypisierung des Antikörpers	129
5.5.5.9	Isolierung und Aufreinigung des Antikörpers aus der Zellkultur mittels Protein-G-Affinitätschromatographie	129
5.5.5.10	Isolierung und Aufreinigung des Antikörpers aus der Aszitesflüssigkeit mittels Protein-G-Affinitätschromatographie	130
5.5.5.11	Bestimmung des Antikörpertiters	130
5.5.5.12	Bestimmung der Kreuzreaktivität	131
5.5.6	<i>In-vitro</i> -Translationsassay	131
6.	Anhang	134
6.1	Aminosäuresequenzen von natürlichem Gelonin	134
6.2	DNA und Aminosäuresequenz von His₆^T-Gelonin₁₋₂₅₁.....	135
6.3	Plasmidkarte von pET-Gel.....	136
7.	Literaturverzeichnis.....	137
	Danksagung.....	146
	Lebenslauf	148

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Antigenerkennung durch zytotoxische T-Zellen und T-Helferzellen.....	3
Abbildung 1.2: Vereinfachtes Schema der humoralen und zellulären Immunantwort.....	5
Abbildung 1.3: Vereinfachtes Schema der humoralen Immunantwort (Antikörperreaktionen)	6
Abbildung 1.4: Grundstruktur und funktionelle Zuordnung der molekularen Abschnitte eines IgG Antikörpermoleküls	7
Abbildung 1.5: Herstellung monoklonaler Antikörper mittels Hybridom-Technik	10
Abbildung 1.6: Möglicher Wirkmechanismus der Immunotoxine	12
Abbildung 1.7: Häufig eingesetzte Kopplungsreagenzien.....	18
Abbildung 1.8: Reaktionsschema zur Herstellung des anti-PD-1-Gelonin-Konjugats	20
Abbildung 3.1: SDS-PAGE (12%iges Trenngel) der isolierten Geloninfraktionen	25
Abbildung 3.2: SDS-PAGE (12%iges Trenngel) der aufgesammelten Fraktionen während der Nickelaffinitätschromatographie	27
Abbildung 3.3: Immunologische Charakterisierung der Geloninfraktionen mittels (a) ELISA und (b) Western-Blot.....	28
Abbildung 3.4: SDS-PAGE (12%iges Trenngel) der Thrombinspaltung.....	29
Abbildung 3.5: Ergebnis der Charakterisierung des anti-PD-1-Antikörpers (Klon 1H10) mittels Durchflusszytometrie	32
Abbildung 3.6: Ergebnis der Charakterisierung des anti-PD-1-Antikörpers (Klon 4F10) mittels Durchflusszytometrie	32
Abbildung 3.7: Chromatogramm der Gelfiltrationschromatographie des mit 2-Iminothiolan modifizierten natürlichen Gelonins	34
Abbildung 3.8: Chromatogramme der Gelfiltrationschromatographie des mit 2-Iminothiolan modifizierten anti-PD-1-Antikörpers	36
Abbildung 3.9: Chromatogramm der Größenaufschlusschromatographie des mit BMME modifizierten natürlichen Gelonins	39
Abbildung 3.10: SDS-PAGE (7%ige Trenngele, nicht reduzierende Bedingungen) zum Nachweis von gebildetem Konjugat	41
Abbildung 3.11: Chromatogramm der Aufreinigung des Konjugats mit natürlichem Gelonin mittels HPLC.....	42
Abbildung 3.12: SDS-PAGE (7%iges Trenngel, nicht reduzierende Bedingungen) zum Konjugatnachweis nach der Kopplungsreaktion mit rGel	46

Abbildung 3.13: Chromatogramm der Aufreinigung des Konjugats mit rekombinatem Gelonin mittels HPLC.....	47
Abbildung 3.14: SDS-PAGE (7%iges Trenngel, nicht reduzierende Bedingungen) zum Nachweis von Konjugat nach der Kopplungsreaktion mit gesteigerten Konzentrationen	51
Abbildung 3.15: Chromatogramm der Aufreinigung des Konjugats mit rekombinatem Gelonin mittels ÄKTA.	52
Abbildung 3.16: SDS-PAGE (7%iges Trenngel, nicht reduzierende Bedingungen) der gesammelten ÄKTA-Fraktionen von Peak 1	53
Abbildung 3.17: SDS-PAGE (12%iges Trenngel, reduzierende Bedingungen) der gesammelten ÄKTA- Fraktionen von Peak 2.....	53
Abbildung 3.18: SDS-PAGE (7%iges Trenngel, nicht reduzierende Bedingungen) der gesammelten Fraktionen während der Nickelaffinitätschromatographie.....	54
Abbildung 3.19: Ergebnis des spezifischen Nachweises von gebildetem Konjugat mittels ELISA.....	55
Abbildung 3.20: Ergebnis des spezifischen Nachweises von gebildetem Konjugat mittels Western-Blot	56
Abbildung 3.21: Überprüfung der Transfektion mittels Durchflusszytometrie.....	59
Abbildung 3.22: Überprüfung der Bindungsaffinität des anti-PD-1-Gelonin-Konjugats über den anti-PD-1-Antikörper mittels Durchflusszytometrie	60
Abbildung 3.23: Überprüfung der Bindungsaffinität des anti-PD-1-Gelonin-Konjugats über den anti-Gelonin-Antikörper mittels Durchflusszytometrie.....	61
Abbildung 3.24: Überprüfung der Bindungsaffinität des anti-PD-1-Gelonin-Konjugats über den anti-His-Antikörper mittels Durchflusszytometrie.....	62
Abbildung 3.25: Ergebnis des <i>in-vitro</i> -Translationsassays zur Überprüfung der Toxizität des Konjugats nach 65 min.....	65
Abbildung 3.26: Ergebnis der Antikörpertiterbestimmung von Blutprobe 1 der immunisierten Mäuse mittels ELISA	69
Abbildung 3.27: Isotypisierung der Antikörperklone mittels „IsoQuick™ Strips for Mouse Monoclonal Isotyping“	75
Abbildung 3.28: Ergebnis der Isotypisierung der hergestellten Antikörper mittels ELISA...	76
Abbildung 3.29: SDS-PAGE (7%iges Trenngel, nicht reduzierende Bedingungen) der gesammelten Fraktionen während der Protein-G-Affinitätschromatographie	77

Abbildung 3.30: Ergebnis der Isotypisierung nach der Säule mittels ELISA	78
Abbildung 3.31: Ergebnis des Western-Blots mit rekombinantem Gelonin (rGel).....	79
Abbildung 3.32: Ergebnis des Western-Blots mit natürlichem Gelonin (nGel).....	80
Abbildung 3.33: Ergebnis der Antikörpertiterbestimmung der zwei hergestellten Antikörper mittels ELISA.....	82
Abbildung 3.34: Ergebnis des Western-Blots zur Bestimmung der Kreuzreaktivität	84
Abbildung 5.1: Referenzbanden des verwendeten Proteinmarkers	94
Abbildung 6.1: Aminosäuresequenzenvergleich von natürlichem Gelonin nach Nolan (Nolan <i>et al.</i> , 1993) und Rosenblum (Rosenblum <i>et al.</i> , 1995)	134
Abbildung 6.2: DNA- und AS-Sequenz von rGel im Expressionsvektor pET-Gel	135
Abbildung 6.3: Plasmidkarte und Schnittstellen von pET-Gel.....	136

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Ergebnisse des BCA-Tests nach dem Aufkonzentrieren	24
Tabelle 3.2: Ergebnisse der Konzentrationsbestimmung der isolierten Antikörper mittels Nano Drop	31
Tabelle 3.3: Durchschnittliche Einbauraten von Thiolgruppen in natürlichem Gelonin	35
Tabelle 3.4: Ergebnis der Größenbestimmung der anti-PD-1-Antikörper	36
Tabelle 3.5: Durchschnittliche Einbauraten von Thiolgruppen in den anti-PD-1-Antikörper (Klon J43).....	37
Tabelle 3.6: Durchschnittliche Einbauraten von Thiolgruppen in den anti-PD-1-Antikörper (Klon 4F10)	37
Tabelle 3.7: Durchschnittliche Einbauraten von Maleimidgruppen in thiolmodifiziertes Gelonin	39
Tabelle 3.8: Durchschnittliche Einbauraten von Thiolgruppen in rGel und anti-PD-1-AK ...	44
Tabelle 3.9: Durchschnittliche Einbauraten von Maleimidgruppen in thiolmodifiziertes rGel	45
Tabelle 3.10: Durchschnittliche Einbauraten von Thiolgruppen in rGel und anti-PD-1-AK (Klon 4F10)	49
Tabelle 3.11: Durchschnittliche Einbauraten von Maleimidgruppen in thiolmodifiziertes rGel	50
Tabelle 3.12: Ermittelte Werte für die Toxizität des Konjugats und der Konjugatkomponenten	65
Tabelle 3.13: Immunisierungsprotokoll der BALB/c Mäuse	68
Tabelle 3.14: Im ELISA ermittelte positive Wells von Fusion Nr. 3:.....	71
Tabelle 3.15: Im ELISA bestimmte positive Wells der 1. Klonierung:	72
Tabelle 3.16: Im ELISA ermittelte positive Klone nach der 2. Klonierung:	73
Tabelle 3.17: Konzentrationsbestimmung der Fraktionen mittels Nano Drop.....	81
Tabelle 3.18: Kreuzreaktivität der hergestellten Antikörper	83
Tabelle 5.1: Molare Extinktionskoeffizienten der verwendeten Proteine und Substanzen.....	97
Tabelle 5.2: Pipettierschema für gängige Trenn- und Sammelgele	99

Verwendete Abkürzungen

A	Ampere
Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgruppe
AK	Antikörper
AP	alkalische Phosphatase
APC	<i>antigen presenting cell</i>
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BCA	4,4-Dicarboxy-2,2-bichinolinnatriumsalz
BCIP/NBT	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat/Nitroblau Tetrazolium
BMME	Bis-(maleimido)-methylether
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
c	Konzentration
ca.	circa
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cFA	komplettes Freundesches Adjuvans
C _H	schwere Kette der konstanten Region
C _L	leichte Kette der konstanten Region
CLS	<i>cell line service</i>
C-Regionen	konstante Regionen
d	Durchmesser
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOC	Natriumdesoxycholat
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
DT	<i>Diphtherie-Toxin</i>
DTP	4,4'-Dithiodipyridin
DTT	1,4-Dithiothreitol
E	Extinktion

Verwendete Abkürzungen

ε	Extinktionskoeffizient
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
EF	Elutionsfraktion
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
engl.	englisch
<i>et al.</i>	und andere
ER	Endoplasmatisches Retikulum
evtl.	eventuell
Fa.	Firma
F _{ab}	<i>fragment, antigen binding</i>
F _c	<i>fragment, crystallizable</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FKS	fetales Kälberserum
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
FT-ICR-MS	<i>fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry</i>
g	Gramm
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
h	Stunde
HAT	Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
His	Histidin
H-Kette	<i>heavy chain</i>
HPLC	<i>high pressure/performance liquid chromatography</i>
Hrsg.	Herausgeber
HT	Hypoxanthin-Thymidin
IBIOMED	Institut für Biomedizin
IC	inhibitorische Konzentration
iFA	inkomplettes Freundsches Adjuvans
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid

Verwendete Abkürzungen

ITIM	<i>immunoreceptor tyrosin-based inhibitory motif</i>
ITSM	<i>immunoreceptor tyrosin-based switch motif</i>
k. A.	keine Angabe
Kap.	Kapitel
kDa	Kilodalton
l	Länge bzw. Liter
lat.	lateinisch
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
L-Kette	leichte Kette
M	Molar
m	milli bzw. Meter
μ	mikro
min	Minute
MEA	Mercaptoethylamin
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
n	nano
nGel	natürliches Gelonin
OD	optische Dichte
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PD	<i>programmed death</i>
PD-L1	<i>programmed death-ligand 1</i>
PE	<i>Pseudomonas-Exotoxin</i>
PEG	Polyethylenglykol
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
Phe	Phenylalanin
PI	Propidiumiodid
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PNAG	Polynucleotid-Adenosin-Glykosidasen
rGel	rekombinantes Gelonin
RIP	Ribosomen-inaktivierende Proteine
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolutions per minute</i>

Verwendete Abkürzungen

RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SA-PE	Streptavidin-Peroxidase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese mit Natriumdodecylsulfat
SL	Stammlösung
SMCC	N-Succinimidyl-4-(N'-maleimidomethyl)-cyclohexan-1-carboxylat
SPDP	N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)-propionat
Tab.	Tabelle
TBS	<i>tris-buffered saline</i>
T _C	<i>cytotoxic T-cell</i>
TCA	Trichloressigsäure
TCR	<i>T-cell receptor</i>
TEA	Triethanolamin
TEMED	Tetramethylethylendiamin
T _H	<i>T-helper cell</i>
TK	Thymidin-Kinase
T _{reg}	<i>regulatory T-cell</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp	Tryptophan
TU KL	Technische Universität Kaiserslautern
Tyr	Tyrosin
UV	ultraviolett
V	Volt
V _H	schwere Kette der variablen Region
VIS	visible
V _L	leichte Kette der variablen Region
V-Regionen	variable Regionen
WF	Waschfraktion
z. B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem der Wirbeltiere ist ein großes Verbundsystem von Molekülen und Zellen mit der Hauptaufgabe, den Organismus vor Mikroorganismen wie Viren, Bakterien und Parasiten zu schützen. Es ist in der Lage, zwischen „Selbst“ („*eigen*“) und „Nicht-Selbst“ („*fremd*“) zu unterscheiden, und überprüft dazu ständig molekulare Einheiten und entscheidet, welche „*fremd*“ sind, um diese zu zerstören. Hierbei werden die Abwehrmechanismen des Immunsystems in die angeborene und die adaptive Immunabwehr unterteilt (Czihak *et al.*, 1996; Stryer *et al.*, 2007).

Die angeborene, unspezifische Abwehr zeichnet sich durch eine schnelle Immunantwort nach Kontakt mit einem Krankheitserreger aus und bildet die erste Verteidigungslinie bei einer Infektion. Fremde, in den Körper eingedrungene Mikroorganismen oder infizierte Zellen werden hierbei durch Phagozyten (Granulozyten, Makrophagen und dendritische Zellen) erkannt, von ihnen aufgenommen und abgetötet. Im Vergleich zur angeborenen Immunität entwickelt sich die adaptive, spezifische erst im Laufe des Lebens. Sie tritt verzögert ein, verfügt über ein hochspezifisches Erkennungssystem und beseitigt die Erreger. Die adaptive Immunreaktion beruht auf den Lymphozyten und spezifisch entwickelten Antikörpern, durch die eine lang anhaltende Immunität gegenüber Erregern erzielt werden kann. Beide Teilsysteme arbeiten bei der Bekämpfung von Infektionen zusammen (Janeway *et al.*, 2009).

Des Weiteren wird die Immunabwehr in die humorale und die zelluläre Immunantwort eingeteilt. Die humorale (*lat.: umor*, Flüssigkeit) wird von Antikörpern ausgeübt, die durch Lymphozyten sezerniert werden und in Blutplasma und Lymphflüssigkeit zirkulieren. Die Antikörper schützen vor Toxinen, freien Bakterien und Viren in den Körperflüssigkeiten. Die zelluläre Immunantwort ist durch die direkte Wirkung von Lymphozyten bestimmt. Sie wirken gegen die in Körperzellen eingedrungenen Bakterien und Viren, sowie Pilze und Wurmparasiten (Campbell, 1997).

1.1.1 Die Lymphozyten

Die Spezifität der adaptiven Immunantwort wird durch die Lymphozyten bewirkt. An der Zelloberfläche gebundene Antigenrezeptoren sind die Grundlage dieser Spezifität, denn jeder Lymphozyt besitzt einen für ein bestimmtes Antigen spezifischen Rezeptor und überträgt diese Eigenschaften auch auf seine Klone (Alberts *et al.*, 2004). Alle Lymphozyten stammen von den pluripotenten Stammzellen im Knochenmark ab. Sie sind bei der Entstehung zunächst alle gleich und erst später erfolgt, je nach Reifungsort (primäre lymphatische Organe wie Knochenmark und Thymus), eine Differenzierung in B- oder T-Zellen. Die B-Zellen (B-Lymphozyten) sind für die humorale Immunantwort verantwortlich und die T-Zellen (T-Lymphozyten) sind die Träger der zellvermittelten Immunantwort. Nach ihrer Reifung gelangen sie ins Blut und zu den sekundären lymphatischen Organen (Milz, Lymphknoten und Mukosa-assoziierte lymphatische Gewebe), wo sie zirkulieren, bis sie auf Antigene treffen. Erst dann proliferieren sie zu Effektorzellen und später zu langlebigen Gedächtniszellen (Campbell, 1997; Janeway *et al.*, 2009).

1.1.1.1 Die T-Lymphozyten

T-Zellen entstehen im Knochenmark, wandern zur Reifung in den Thymus und gelangen dann zu den sekundären lymphatischen Organen. Sie sind der Hauptträger der zellulären spezifischen Immunantwort. An ihrer Oberfläche befindet sich der membranständige T-Zell-Rezeptor, mit dem Antigene spezifisch gebunden werden können (Campbell, 1997). Dieser T-Zell-Rezeptor (TCR) ist ein glykosyliertes Heterodimer aus einer α - und β -Kette, die über eine Disulfidbrücke miteinander verknüpft sind. Beide Ketten besitzen einen variablen Bereich (V-Region) und einen konstanten Bereich (C-Region) mit Homologie zu den Immunglobulinen (Koolman und Röhm, 2009). Die T-Zellen sind über den TCR nicht in der Lage, native Antigene zu erkennen. Sie reagieren nur mit teilweise abgebauten Protein-Antigenen, die ihnen von Antigen präsentierenden Zellen (APC) an deren Oberfläche dargeboten werden. Für die Präsentation der Antigenpeptide sind die sogenannten MHC-Moleküle verantwortlich. Diese Moleküle sind membrangebundene Glykoproteine, die von Genen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC, *engl.: major histocompatibility complex*) codiert werden (Alberts *et al.*, 2004). Es wird unterschieden zwischen MHC-Klasse-I-Proteinen, die virale Peptide von im Zytosol synthetisierten Proteinen aufnehmen, und MHC-Klasse-II-Proteinen, die Peptide von Krankheitserregern in Vesikeln innerhalb der Zelle binden. Die MHC-

1. Einleitung

Moleküle unterliegen einem starken Polymorphismus, der es unwahrscheinlich macht, dass zwei Individuen den gleichen Satz an MHC-Molekülen haben. Dies ist der Grund für die Abstoßung von Fremdgewebe bei Organtransplantationen (siehe Kap. 1.2.1.1) (Janeway *et al.*, 2009; Koolman und Röhm, 2009).

Die T-Lymphozyten proliferieren nach antigener Stimulierung und differenzieren in verschiedene T-Effektorzellen, die zytotoxischen T-Zellen (T_C), die T-Helferzellen (T_{H1} und T_{H2}), die regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) und die langlebigen T-Gedächtniszellen. Die zytotoxischen T-Zellen erkennen mit Viren infizierte Zellen und töten diese durch Freisetzung von Perforinen ab. Sie erkennen Peptidfragmente, die von MHC-Klasse-I-Proteinen an der Oberfläche einer APC präsentiert werden. Die T-Helferzellen, werden in zwei Unterklassen eingeteilt, die T_{H1} -Zellen, welche für die Aktivierung von Makrophagen verantwortlich sind, und die T_{H2} -Zellen, welche die B-Zellen dazu aktivieren, Antikörper zu sezernieren. Die T-Helferzellen erkennen Peptide, die von Makrophagen oder B-Zellen aufgenommen wurden und über MHC-Klasse-II-Proteine präsentiert werden (Janeway *et al.*, 2009). In Abbildung 1.1 ist die Antigenerkennung von T_C , T_{H1} und T_{H2} über MHC-Moleküle dargestellt.

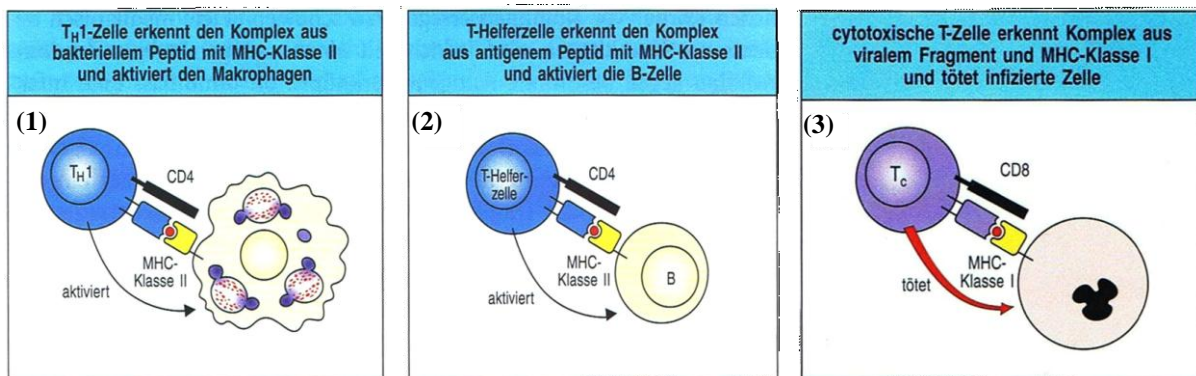


Abbildung 1.1: Antigenerkennung durch zytotoxische T-Zellen und T-Helferzellen: (1) Die T_{H1} -Zelle erkennt ein von einem MHC-II-Protein präsentiertes Antigen und aktiviert den präsentierenden Makrophagen zur Zerstörung intrazellulärer Bakterien. (2) Die T_{H2} -Zellen aktivieren B-Zellen dazu, Antikörper zu produzieren, nachdem sie ein Antigen, das von MHC-II-Proteinen präsentiert wird, erkannt haben. (3) Durch Erkennung eines von einem MHC-I-Protein präsentierten Antigens wird die T_C -Zelle aktiviert und tötet die Zelle ab (Janeway *et al.*, 2009).

An der Erkennung von Zielzellen sind auch die Corezeptoren CD8 und CD4 (*engl.: cluster of differentiation*) beteiligt. Hierbei handelt es sich um Oberflächenproteine der T-Zellen, die Marker auf den Zielzellen binden. CD8 wird von zytotoxischen T-Zellen gebildet und bindet spezifisch an MHC-I-Proteine, während CD4 von T-Helferzellen exprimiert wird und MHC-II-Proteine erkennt (Stryer *et al.*, 2007). Die regulatorischen T-Zellen tragen ebenfalls CD4 an ihrer Zelloberfläche, ihre Funktion ist allerdings, die T-Zell-Antworten zu hemmen und nicht zu aktivieren. Dadurch begrenzen sie die Immunantwort und Autoimmunreaktionen werden unterdrückt (Janeway *et al.*, 2009).

1.1.1.2 Die B-Lymphozyten

B-Zellen entstehen aus einer Vorläuferzelle im Knochenmark (*engl.: bone marrow*) und reifen dort heran. Sie sind Träger der humoralen Immunantwort und durchlaufen während ihrer Entwicklung verschiedene Differenzierungsstadien, bis die zwei Endstadien, die Plasmazelle und die Gedächtniszelle, erreicht sind. An der Oberfläche der B-Zellen befinden sich Kopien von spezifischen Antigen-Rezeptoren, auch B-Zell-Rezeptoren genannt, die Antigene binden können. Durch die Bindung eines Antigens wird die B-Zelle stimuliert und beginnt sich zu teilen und zu differenzieren. Nach dem Prinzip der klonalen Selektion entsteht ein Klon von Effektorzellen mit derselben Spezifität, dieser vermehrt sich weiter und wird zu einer Antikörper sezernierenden Plasmazellenpopulation oder zu einer langlebigen Gedächtniszellenpopulation. Die Plasmazelle besitzt keine Antigen-Bindungsstellen mehr, da sie nur noch für die Synthese und Eliminierung eines spezifischen Antikörpertyps zuständig ist. Die Gedächtniszellen erkennen Antigene, die erneut in den Organismus eindringen und können schneller die passenden Antikörper synthetisieren. Dadurch werden Infektionen verhindert oder abgeschwächt (Czihak *et al.*, 1996; Campbell, 1997).

In Abbildung 1.2 ist ein Schema der zellulären und humoralen Immunantwort des adaptiven Immunsystems dargestellt. Hier werden die Abläufe und das Zusammenspiel der beiden Systeme noch einmal verdeutlicht.

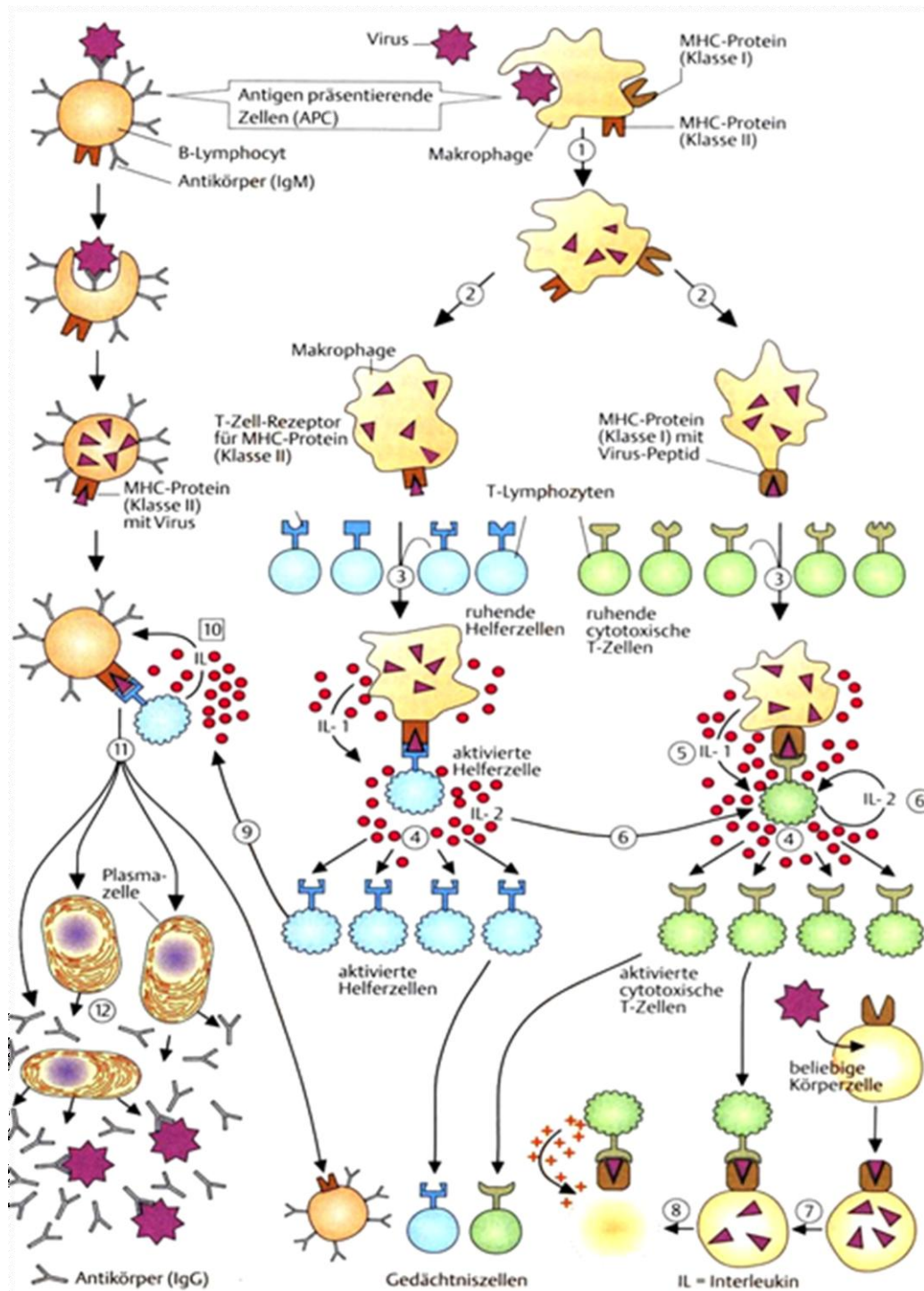


Abbildung 1.2: Vereinfachtes Schema der humoralen und zellulären Immunantwort: Ein Pathogen (z. B. Virus) wird von einer Antigen präsentierenden Zelle (APC) aufgenommen, teilweise abgebaut (1) und die Fragmente werden mit Hilfe von MHC-Molekülen auf der Oberfläche der APC präsentiert (2). T-Zellen können über einen passenden T-Zell-Rezeptor (TCR) den MHC-Komplex erkennen und an die APC binden (3), dies führt zur Aktivierung der entsprechenden T-Zelle und selektiver Vermehrung (4). Die klonale Selektion wird durch die Ausschüttung von Interleukinen (IL) angeregt (5,6) und es entstehen T-Zellen mit unterschiedlichen Aufgaben. Die zytotoxischen T_C-Zellen (grün) erkennen und binden virusinfizierte Zellen über MHC-I-Komplexe (7) und töten diese ab (8). Die T_H-Zellen (blau) binden an B-Zellen, die an ihrer Oberfläche MHC-II-Komplexe präsentieren (9). Durch Ausschüttung von Interleukinen kommt es zur klonalen Selektion und Vermehrung der B-Zellen (10), die zu Plasmazellen heranreifen (11) und Antikörper sezernieren (12) (Koolman und Röhm, 2009).

1.1.2 Immunglobuline

Antikörper, die in ihrer Gesamtheit auch als Immunglobuline bezeichnet werden, sind antigenspezifisch und werden von den Plasmazellen als Reaktion auf eine Infektion gebildet. Alle Antikörper gehören zu den Plasmaproteinen und sind aus vier Polypeptidketten aufgebaut, werden aber funktionell und biochemisch in fünf Klassen (IgM, IgD, IgG, IgA und IgE) eingeteilt. Jede Klasse führt eine spezifische Kombination von Reaktionen bei der Immunantwort aus, dabei werden drei Hauptmechanismen (siehe Abb. 1.3) unterschieden. Die Neutralisation, bei der die Antigene gebunden werden, damit sie nicht an andere Zellen binden können, die Opsonisierung, bei der die Krankheitserreger und Fremdpartikel eingehüllt werden, und die Aktivierung des Komplementsystems (Janeway *et al.*, 2009).

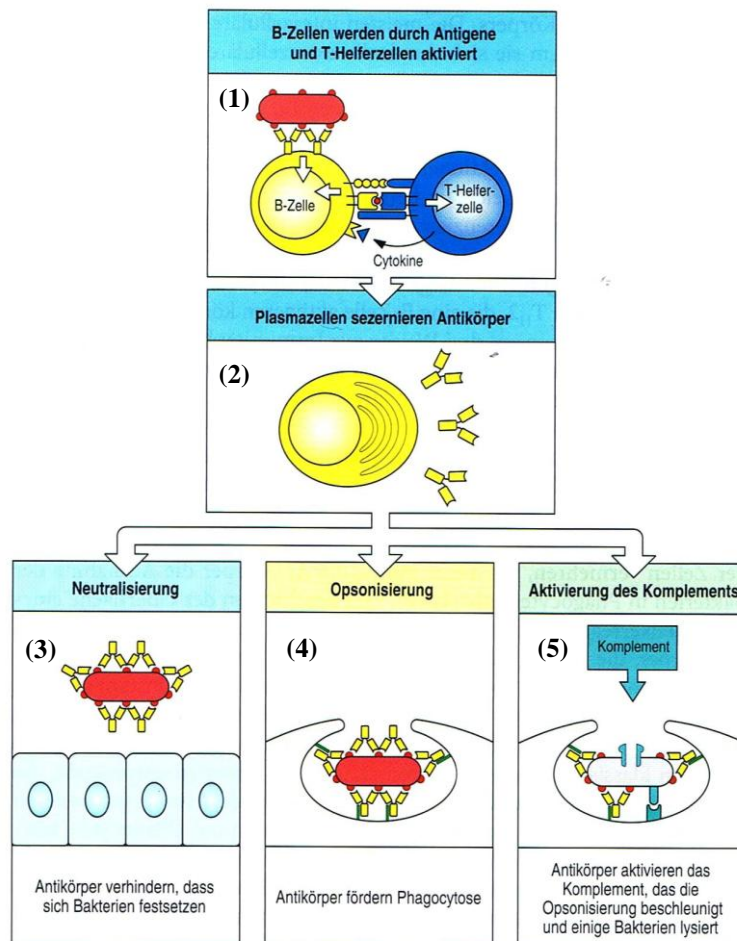


Abbildung 1.3: Vereinfachtes Schema der humoralen Immunantwort (Antikörperreaktionen): Ein Antigen bindet an den B-Zell-Rezeptor, wird aufgenommen und in Peptide zerlegt, die T-Helferzellen aktivieren (1). Durch die Signale des Antigens und der T-Helferzelle teilt sich die B-Zelle und differenziert in eine Plasmazelle, die Antikörper sezerniert (2). Es werden 3 unterschiedliche Antikörperreaktion ausgelöst: (3) Die Neutralisierung, bei der Antigene gebunden werden bevor sie an andere Zellen binden, (4) die Opsonisierung, bei der die Antigene umhüllt und dadurch von anderen Zellen aufgenommen und abgetötet werden, und (5) die Aktivierung des Komplementsystems, das zur Verstärkung der Opsonisierung und Zelllyse führt (Janeway *et al.*, 2009).

1. Einleitung

Ein Antikörpermolekül besteht aus zwei identischen leichten Ketten (L-Ketten; *engl.: light chains*) und zwei identischen schweren Ketten (H-Ketten; *engl.: heavy chains*), die über Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. Die gleiche Bindungsart verknüpft die beiden leichten Ketten mit jeweils einer schweren Kette und sie stabilisiert die Tertiärstruktur innerhalb der Domänen. Sowohl die L- als auch die H-Ketten bestehen aus Unterregionen, die ca. 110 Aminosäuren enthalten. Im Vergleich zur L-Kette, die sich aus den zwei Domänen C_L und V_L zusammensetzt, besteht die H-Kette aus den vier Domänen V_H , C_{H1} , C_{H2} und C_{H3} . (Koolman und Röhm, 2009). Die variablen Bereiche (V-Regionen) der L- und der H-Kette bilden die Antigenbindungsstelle. Die konstanten Bereiche (C-Regionen) sind innerhalb einer Antikörperklasse alle gleich. Es werden zwei Arten von L-Ketten, die λ - und κ -Kette, sowie 5 Klassen von H-Ketten, die μ -, δ -, γ -, α - und ϵ -Kette, innerhalb der konstanten Bereiche unterschieden (Janeway *et al.*, 2009). Der Antikörper lässt sich durch Enzyme, z. B. Papain, am Scharnier (*engl.: hinge*) spalten und es entstehen zwei identische F_{ab} -Fragmente (*engl.: fragment, antigen binding*) und ein F_c -Fragment (*engl.: fragment, crystallizable*) (Clark und Pazdernik, 2009). Die Grundstruktur eines IgG-Antikörpers ist in Abbildung 1.4 dargestellt.

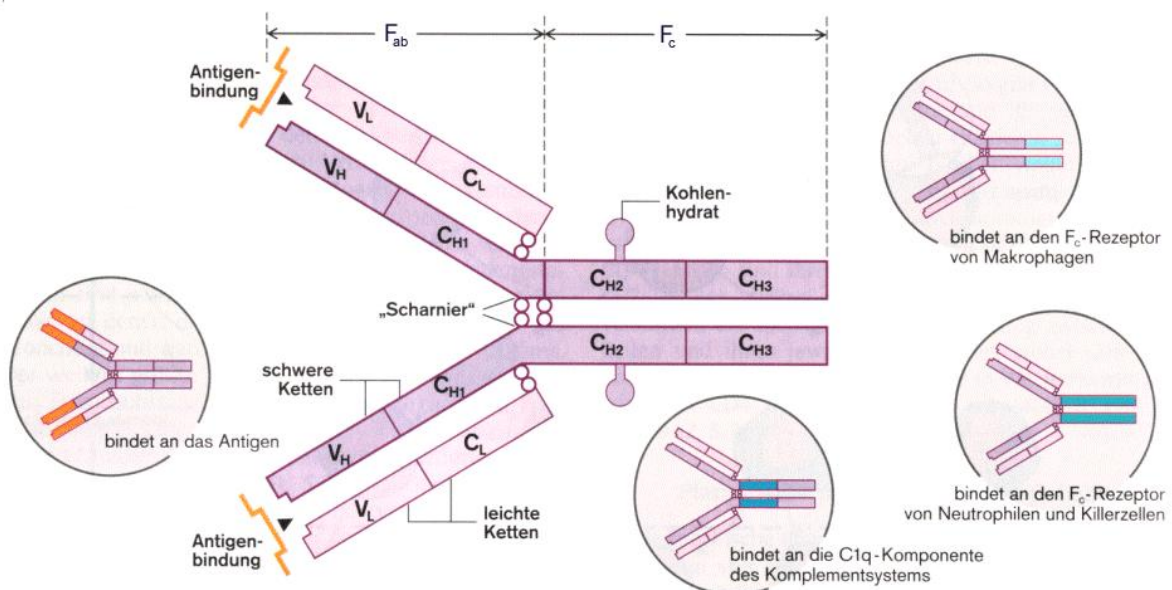


Abbildung 1.4: Grundstruktur und funktionelle Zuordnung der molekularen Abschnitte eines IgG Antikörpermoleküls (Klinke *et al.*, 1996)

Immunglobuline der Klasse IgM werden nach Kontakt mit fremden Antigenen, vor allem Mikroorganismen, als erste Antikörper gebildet. Die am häufigsten vorkommenden IgG-Antikörper befinden sich im Blutstrom, können mit Hilfe von Rezeptoren als einzige die Plazenta passieren und werden auf den Fötus übertragen. Der IgA-Antikörper kommt in Körpersekreten und im Intestinaltrakt vor und IgE dient dem Schutz vor Parasiten und ist bei allergischen Reaktionen erhöht. Die Funktion von IgD ist noch nicht geklärt (Koolman und Röhm, 2009).

1.1.2.1 Monoklonale Antikörper und ihre Anwendung

Antikörper finden viele Anwendungsmöglichkeiten in der biochemischen Forschung und der medizinischen Diagnostik. Sie werden z. B. zum Nachweis von Proteinen, die für bestimmte krankheitsauslösende Agenzien charakteristisch sind, oder für Schwangerschaftstests eingesetzt. Hierzu finden sie Anwendung in wichtigen Immunoassays wie z. B. ELISA (*engl.: enzyme-linked immunosorbent assay*), Western-Blot oder FACS (*engl.: fluorescence-activated cell sorting*) (Clark und Pazdernik, 2009). Zunehmend werden sie auch in der Therapie von Krebs, z. B. Trastuzumab (Herceptin) zur Behandlung von Brustkrebs, und anderen Erkrankungen eingesetzt (Stryer *et al.*, 2009).

Zum Einsatz in Immunoassays und in der Therapie ist eine große Menge an reinen Antikörpern nötig. Polyklonale Antikörper werden von verschiedenen B-Zellen, die das gleiche Antigen erkennen, synthetisiert. Sie enthalten also ein Gemisch aus Antikörpern und variieren in ihrer Spezifität und Affinität (Clark und Pazdernik, 2009). Ihr Einsatz in der Diagnostik und Therapie hat seit der Entwicklung der Herstellung monoklonaler Antikörper durch Köhler und Milstein (Köhler und Milstein, 1975) an Bedeutung verloren.

Monoklonale Antikörper zeichnen sich durch ihre hohe Spezifität aus, da sie nur ein einzelnes Epitop (strukturelle Einheit) des Antigens erkennen. Die Zellen, die sie produzieren, stammen von einer einzigen Antikörper produzierenden Zelle (B-Zelle) ab. Das bedeutet, dass alle Antikörpermoleküle identisch sind, die gleiche Bindungsaffinität zum Antigen haben und die gleiche Stabilität besitzen (Dübel, 2007; Koolman und Röhm, 2009). Die monoklonalen Antikörper können mittels der Hybridom-Technik (siehe Kap. 1.1.2.2) in großen Mengen produziert werden.

1.1.2.2 Herstellung monoklonaler Antikörper

Im Jahre 1975 entwickelten Köhler und Milstein (Köhler und Milstein, 1975) die Hybridom-Technik, die eine Herstellung monoklonaler Antikörper erlaubt. Dies war lange Zeit nicht möglich, da die dabei verwendeten isolierten Zellen aus der Milz in Zellkultur nur wenige Tage überleben. Dafür erhielten sie 1984 zusammen mit Jerne den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin (Milstein, 1985; Köhler, 1985; Jerne, 1985). Die Technik beruht auf der Fusion von Myelomzellen (Krebszellen) mit kurzlebigen Milzzellen, wodurch „unsterbliche“ Hybridzelllinien (Hybridome) entstehen, die Antikörper einer hohen Spezifität produzieren.

Die Herstellung der monoklonalen Antikörper lässt sich in 6 verschiedene Schritte unterteilen: 1. Immunisierung einer Maus und Isolierung der Milzzellen, 2. Fusionierung der Milzzellen mit Myelomzellen, 3. Kultivierung und Selektion der entstandenen Hybridomzellen in HAT-Medium, 4. Klonierung der Antikörper produzierenden Zellen, 5. Reklonierung der positiven Kulturen, 6. Massenproduktion der Antikörper *in vitro* oder *in vivo* (Koolman und Röhm, 2009). In Abbildung 1.5 ist der Ablauf der Hybridom-Technik dargestellt.

Bei der Immunisierung ist zu beachten, dass eine minimale Antigenkonzentration über einen längeren Zeitraum aufrecht erhalten werden muss, um eine erfolgreiche Immunisierung zu gewährleisten (Peters und Baumgarten, 1990). Deshalb wird über einen Zeitraum von 3-6 Monaten (Langzeitimmunisierung) das Antigen in die Mäuse injiziert, bis ein hoher Antikörper-Gehalt im Serum der Maus nachweisbar ist. Dieser korreliert mit einem hohen Anteil von spezifischen sensibilisierten B-Zellen in der Milz. Optimal ist es, die Mäuse drei Tage vor der Fusion noch einmal zu immunisieren, um antigenspezifische B-Zellen wieder zu aktivieren (Bessler und Baron, 1988). Zur unspezifischen Verstärkung der Immunantwort wird das Antigen in einem Adjuvans (z. B. Freundesches Adjuvans) injiziert, dies führt zur Abgabe des Antigens über einen längeren Zeitraum (Dübel, 2007; Herbert, 1973; Freund, 1956).

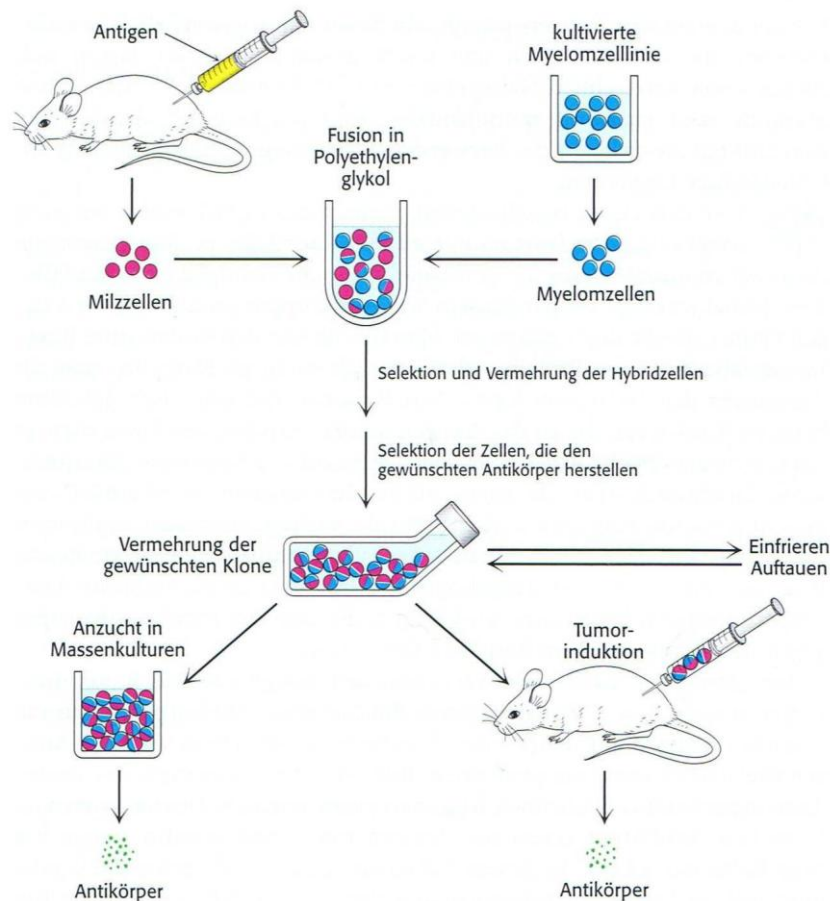


Abbildung 1.5: Herstellung monoklonaler Antikörper mittels Hybridom-Technik: Der Maus wird ein Antigen injiziert und ein paar Wochen später werden die Antikörper produzierenden Zellen (rosa) aus der Milz isoliert und in Polyethylenglykol mit der zuvor kultivierten Myelomzelllinie (blau) fusioniert. Die entstandenen „unsterblichen“ Hybridomzellen wachsen in einem selektiven Medium und werden auf Antikörperproduktion getestet. Nach mehrfacher Klonierung und Selektion werden die gewünschten Klone entweder in der Zellkultur oder in der Maus vermehrt und die Antikörper aus dem Zellkulturüberstand oder der Aszitesflüssigkeit isoliert (Stryer *et al.*, 2009).

Bei der Fusion der Milzzellen mit den Myelomzellen entstehen vier verschiedene Zellpopulationen: 1. nicht fusionierte B-Zellen, die in Kultur innerhalb von drei Wochen absterben; 2. falsche Hybridome, die z. B. durch Mehrfachfusionen entstanden sind. Diese Zellen sterben ebenfalls wenige Tage nach der Fusion; 3. gewünschte Hybridome, die sehr selten entstehen, sind sehr empfindlich und teilen sich erst nach fünf bis sieben Tagen; 4. nicht fusionierte Myelomzellen, die sehr robust sind, können sich sofort teilen und die gewünschte Hybridome überwuchern. Um diese Zellen am Weiterwachsen zu hindern, werden für die Fusion durch Mutation in ihrer Biochemie veränderte Myelomzellen eingesetzt. Die Zellen haben auf Grund der Mutation einen Defekt in einem der beiden Enzyme TK (Thymidin-Kinase) bzw. HGPRT (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase). Zur Selektion werden die Zellen nach der Fusion in HAT-Medium (Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin) kultiviert und die

nicht fusionierten Myelomzellen sterben ab, da der Hauptstoffwechselweg zur Synthese der Nucleosid-Triphosphate durch den Hemmstoff Aminopterin blockiert ist und der Nebenweg (*salvage pathway*) durch die Mutation in TK oder HGPRT nicht durchlaufen werden kann. Die gewünschten Hybridome können in HAT-Medium zwar auch nicht den Hauptstoffwechselweg durchlaufen, aber der Nebenweg ist intakt, da bei der Fusion die gesamte genetische Information der B-Zelle auf die Hybridome übertragen wird (Bessler und Baron, 1988; Goding, 1986).

Der Nachweis der produzierten Antikörper erfolgt z. B. mit ELISA. Zur Herstellung einer stabilen Hybridomzelllinie ist eine schnelle Klonierung sehr wichtig. Dabei werden die Klone vereinzelt, vermehrt und erneut auf Antikörperproduktion getestet. Bevor die Massenproduktion eines Antikörpers gestartet werden kann, sollten die Hybridome mindestens 2-mal kloniert werden (Dübel, 2007).

1.2 Immunotoxine

Immunotoxine sind als sogenannte „Wundermittel“ (*magic bullets*) bei der Heilung von Krebs (Pastan *et al.*, 2007), bei Autoimmunerkrankungen (Hossann *et al.*, 2006) und in der Transplantationsmedizin (Grossbard, 1993) von großem Interesse in der pharmazeutischen Forschung. Ihre Geschichte begann schon vor über 100 Jahren, als von Ehrlich (Ehrlich, 1900) das Konzept der „magic bullets“ postuliert wurde, das auf die Suche spezieller Stoffe, mit denen Krebszellen selektiv vernichtet werden können, abzielt (Bosch und Rosich, 2008). Sie sind eine vielversprechende Therapiemöglichkeit im Vergleich zu Chemotherapeutika oder Immunsuppressiva, da sie Zellen selektiv abtöten und nicht alle Zellen des Organismus angreifen. Einige befinden sich bereits in der klinischen Prüfung (Kreitman, 2009; Pastan *et al.*, 2006).

Immunotoxine sind Proteine, die sich aus einer Toxinkomponente und einer Ligandenkomponente zusammensetzen. Die Ligandenkomponente sorgt für die Spezifität und die Toxinkomponente tötet die Zellen ab. Zur Verknüpfung der beiden Komponenten erfolgt entweder eine chemische Kopplung oder eine gentechnische Fusion (Choudhary *et al.*, 2011). Der genaue Wirkmechanismus ist abhängig von der Art des verwendeten Toxins. In Abbildung 1.6 ist ein möglicher Mechanismus dargestellt.

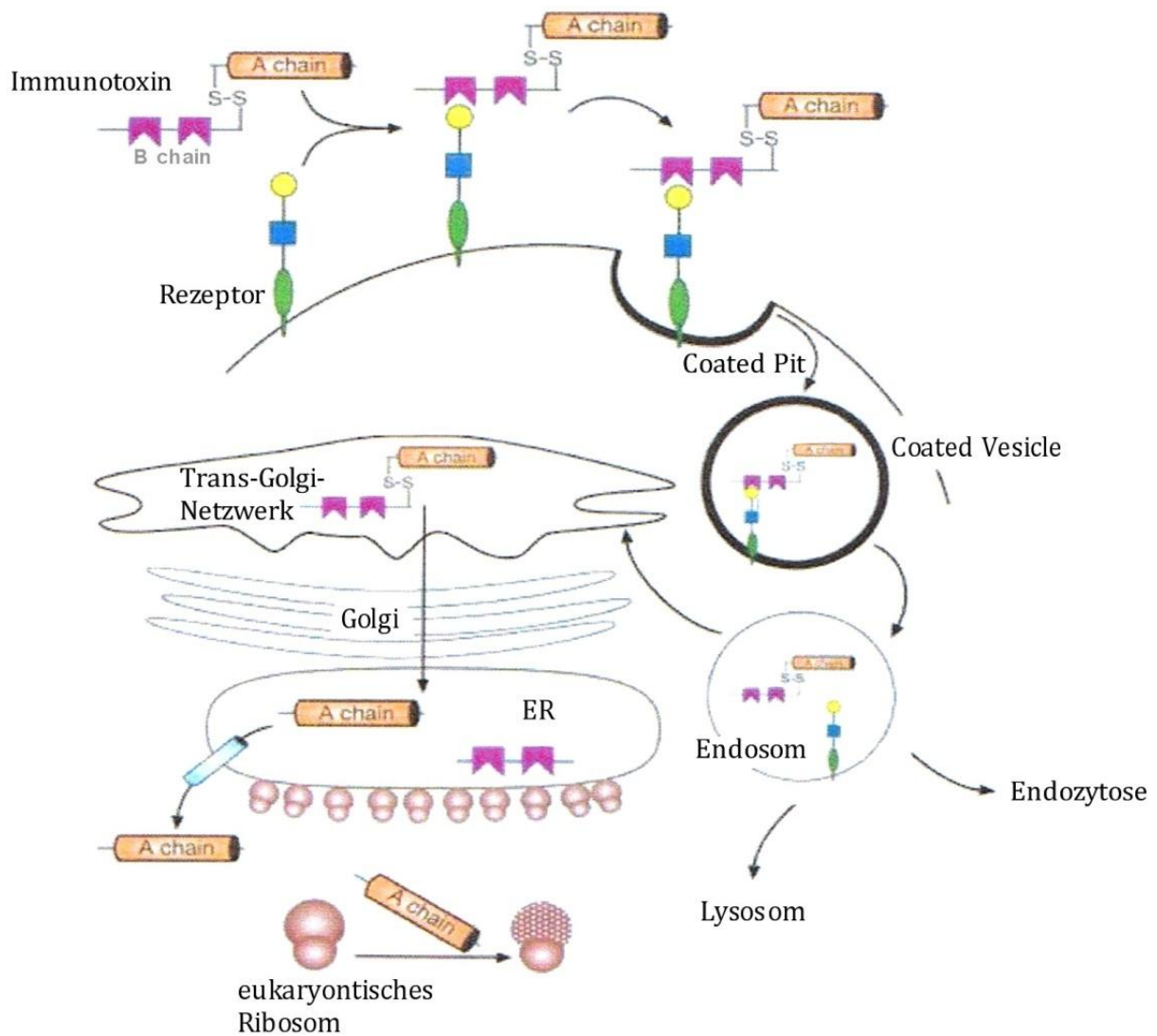


Abbildung 1.6: Möglicher Wirkmechanismus der Immunotoxine: Das Immunotoxin bindet mit der Ligandenkomponente spezifisch den komplementären Rezeptor der Oberfläche der Zielzellen. Durch Rezeptorvermittelte Endozytose gelangt der Immunotoxin-Rezeptor-Komplex über ein Coated Vesicle in die Zelle und in ein Endosom. Dort wird das Konjugat gespalten und es erfolgt eine Translokation von Toxin und Ligand ins Trans-Golgi-Netzwerk. Die Komponenten werden sortiert, das Toxin wird ins Zytosol abgegeben, hemmt an den Ribosomen die Proteinbiosynthese und die Zelle stirbt ab. Alternativ wird das Toxin lysosomal abgebaut und die Toxizität geht verloren (Schanz, 2009; Lord und Roberts, 1998).

1.2.1 Die Ligandenkomponente

Die Ligandenkomponente ermöglicht dem Toxin in bestimmte Zellen zu gelangen, indem sie spezifisch an ihren komplementären Rezeptor auf der Oberfläche dieser Zellen bindet, wobei das Immunotoxin über Rezeptor-vermittelte Endozytose aufgenommen wird (Choudhary, 2011). Die am häufigsten verwendeten Ligandenkomponenten in Immunotoxinen sind monoklonale Antikörper (Ghetie *et al.*, 2001). Dabei sind die Spezifität und die Avidität des Antikörpers für die Wirkung des Immunotoxins von großer Bedeutung. Es werden nicht nur intakte Antikörper sondern auch Antikörperfragmente für die Kopplung eingesetzt, da sie weniger immunogen sind als das komplette Molekül und z. B. besser in Krebsgewebe hinein gelangen. Sie haben allerdings den Nachteil, dass die Halbwertszeit *in vivo* herabgesetzt und der Aktivitätsverlust bei der Kopplung höher ist. Antikörper werden in der Krebstherapie (Kreitman, 2006) und der Transplantationsmedizin (Filipovich *et al.*, 1990; Martin *et al.*, 2004) als Bestandteile von Immunotoxinen eingesetzt. In der Krebstherapie werden auch Wachstumsfaktoren als Ligandenkomponenten eingesetzt, sie besitzen eine geringe Immunogenität und eine hohe Affinität zu ihrem Rezeptor (Pastan *et al.*, 1986).

Antigene oder Antigenfragmente können ebenfalls als Ligandenkomponenten verwendet werden, sie wurden z. B. bei Mäusen und Ratten zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen wie *Myasthenia gravis* eingesetzt (Brust *et al.*, 1987; Urbatsch *et al.*, 1993; Hossann *et al.*, 2006). Hierbei reagiert das Autoantigen hochspezifisch mit den Immunzellen, die gegen es gerichtet sind, und das Toxin tötet die Zellen ab. Die Reinheit des verwendeten Antigens spielt eine große Rolle, da es sonst zu einer erneuten Immunisierung kommt.

1.2.1.1 Transplantation

Organtransplantationen zum Ersatz erkrankter Organe gehören heute zum klinischen Alltag. Es gibt allerdings einige Hindernisse, die den Patienten das Leben mit einem Transplantat erschweren. Es kann zu Immunreaktionen und somit zu einer Abstoßungsreaktion des transplantierten Organs kommen. Eine spezifische Hemmung dieser Reaktionen ist nicht möglich, deshalb müssen die Patienten sogenannte Immunsuppressiva zur Unterdrückung der Immunabwehr einnehmen. Dazu gehören Medikamente wie z. B. Cyclosporin A und FK506. Diese hemmen die T-Zell-Signalübertragung und verhindern somit die T-Zell-Aktivierung. Die humorale Immunantwort wird hierbei aber nicht beeinträchtigt. Eine Nebenwirkung

1. Einleitung

dieser Medikamente ist das erhöhte Risiko des Patienten an Krebs oder Infektionen zu erkranken (Janeway *et al.*, 2009; Campbell, 1997, Ho *et al.*, 1996).

Verantwortlich für die Transplantatabstoßung sind Alloantigene auf dem Transplantat, die eine alloreaktive Immunantwort auslösen. Bei Alloantigenen handelt es sich um Antigene, die sich bei einzelnen Individuen einer Spezies unterscheiden und als fremd erkannt werden. Von großer Bedeutung bei der Abstoßungsreaktion sind die hochpolymorphen MHC-Moleküle (siehe Kap. 1.1.1.1). Diese lösen, wenn sich die MHCs von Spender und Empfänger unterscheiden, eine alloreaktive Immunantwort aus. Zur Verbesserung der Erfolgsquote von Transplantationen ist eine Übereinstimmung der MHC-Typen von Spender und Empfänger wichtig, aber Abstoßungsreaktionen sind trotzdem nicht ausgeschlossen (Janeway *et al.*, 2009; Matzinger *et al.*, 1977).

Damit es zu einer T-Zell-vermittelten Immunantwort und damit zur akuten Abstoßung des Transplantats kommt, müssen die T-Zellen zuerst durch APCs aktiviert werden. Dies geschieht durch die alloenen MHC-Moleküle, die sich an der Oberfläche der APCs befinden, und die co-stimulierende Aktivität der APCs. Die alloreaktive Immunantwort kann auf zwei unterschiedlichen Wegen ausgelöst werden, durch die direkte oder die indirekte Allogenerkennung. Bei der direkten Allogenerkennung verlassen die APCs des Spenders das Transplantat und gelangen über die Lymphbahn in die Lymphknoten, wo sie direkt die T-Zellen des Empfängers aktivieren. Die so aktivierten alloreaktiven T-Zellen greifen dann das Transplantat direkt an, deshalb ist dieser Erkennungsweg wahrscheinlich verantwortlich für eine akute Abstoßungsreaktion. Bei der indirekten Allogenerkennung werden die alloenen Proteine des Spenders von APCs des Empfängers aufgenommen und an deren Oberfläche mit Hilfe eigener MHC-Moleküle den T-Zellen indirekt präsentiert. Dieser Erkennungsweg trägt vermutlich zur Abstoßung durch Aktivierung von Makrophagen und zur Entwicklung einer Alloantikörperreaktion gegen das Transplantat bei (Janeway *et al.*, 2009; Gould *et al.*, 1999).

1.2.1.2 PD-1/PD-L1-Signalweg

Bei Organversagen im Endstadium sind Transplantationen meistens die einzige Möglichkeit, ein Überleben des Patienten zu gewährleisten. Hierbei stellen Immunreaktionen gegen das Transplantat ein großes Problem dar, deshalb müssen die Patienten Immunsuppressiva einnehmen, um die Immunantwort zu unterdrücken und eine Transplantattoleranz zu erreichen. Ziel der Forschung ist es, die Dosis dieser Medikamente zu reduzieren, um Nebenwirkungen zu vermindern und den Patienten das Leben zu erleichtern. Ein Ansatzpunkt ist hier die Manipulation von Signalen, die zwischen APCs und T-Zellen ausgetauscht werden. Die T-Zellen müssen bei der immunologischen Reaktion sowohl aktiviert als auch inhibiert werden, dazu gibt es zwei Gegenspieler, einen co-stimulierenden und ein co-inhibierenden Signalweg. Der PD-1/PD-L1-Signalweg übernimmt eine Schlüsselrolle bei der Regulation der Abstoßung von allogenem Gewebe nach der Transplantation. Es wurde gezeigt, dass Interaktionen zwischen PD-1 und PD-L1 über die Kontrolle von alloreaktiven T-Zellen am Anwachsen von Organen beteiligt sind. Außerdem wurde nachgewiesen, dass PD-1 an der Oberfläche von alloreaktiven T-Zellen signifikant hochreguliert ist (Keir *et al.*, 2008; Del Rio *et al.*, 2008).

PD-1 (*engl.: programmed death-1*), auch CD279 genannt, ist ein 50–55 kDa schweres Typ-I-Transmembranrezeptorprotein der Ig-Superfamilie, das auf der Oberfläche von T-Zellen exprimiert wird (Agata *et al.*, 1996). Es wurde erstmals von Ishida (*Ishida et al.*, 1992) in einer T-Zell-Hybridomlinie (2B4.11) entdeckt. Der Rezeptor PD-1 besteht aus einer extrazellulären, variablen Immunglobulin-Domäne und einer intrazellulären Domäne. Der intrazelluläre Teil setzt sich aus zwei auf Tyrosin basierenden Signalmotiven, dem ITIM (*engl.: immunoreceptor tyrosin-based inhibitory motif*) und den ITSM (*engl.: immuno-receptor tyrosin-based switch motif*) zusammen. PD-1 kann nur eine Inhibierung des TCR-Signals verursachen, wenn er seinen Liganden PD-L1, der auf der Oberfläche von APCs exprimiert wird, bindet. Hierbei wird die Hemmung der T-Zelle durch das ITSM des PD-1 vermittelt, da es eine co-inhibitorische Signalkaskade startet (Del Rio *et al.*, 2008).

Ein Zusammenspiel von co-inhibitorischen und co-stimulatorischen Signalwegen führt zu einem Gleichgewicht bei der T-Zell-Aktivierung und verhindert eine übermäßige T-Zell-Antwort. Zum Beispiel aktiviert der B7/CD28-Signalweg naive T-Zellen und stimuliert sie zu T-Effektorzellen zu reifen, während der PD-1/PD-L1-Signalweg diesen Vorgang inhibiert.

PD-1 ist ein guter Ansatzpunkt, um die allogene Immunantwort zu regulieren. Denn es wurde in murinen *in-vivo*-Experimenten gezeigt, dass Transplantate nach der Blockierung von PD-1 schneller abgestoßen werden (Corry *et al.*, 1973; Del Rio *et al.*, 2008). Die Entwicklung von anti-PD-1-Antikörpern (Del Rio *et al.*, 2005), die an den Rezeptor PD-1 binden, ermöglicht die Herstellung eines Immunotoxins, mit dem die alloreaktiven T-Zellen spezifisch eliminiert werden können, bevor sie zur Abstoßung des Transplantats führen. Der Einsatz des Immunotoxins könnte somit zu einer geringeren benötigten Dosis an Immunsuppressiva führen.

1.2.2 Die Toxinkomponente

Nachdem das Toxin mit Hilfe der Ligandenkomponente in die Zelle gelangt ist, entfaltet es seine toxische Wirkung und tötet die Zelle ab. Als Toxinkomponenten in Immunotoxinen werden häufig bakterielle Toxine wie z. B. *Pseudomonas-Exotoxin* (PE) und *Diphtherie-Toxin* (DT) oder pflanzliche Toxine wie z. B. Ricin, Saporin und Gelonin eingesetzt (Choudhary *et al.*, 2011). Diese Toxine haben die gemeinsame Eigenschaft, die Ribosomen und somit die Eiweißbiosynthese zu inhibieren, deshalb werden sie auch als Ribosomeninaktivierende Proteine (RIP) bezeichnet (Kreitman, 2009). Gegenüber Chemotherapeutika haben sie den Vorteil, auch ruhende Zellen, die sich nicht im Teilungsstadium befinden, abzutöten. Außerdem reichen bereits geringe Dosen für eine effektive Wirkung, denn die Toxine sind Enzyme und werden bei der Reaktion nicht verbraucht, so können mehrere Reaktionszyklen durchlaufen werden.

1.2.2.1 Ribosomen-inaktivierende Proteine

Ribosomen-inaktivierende Proteine (RIPs) sind Enzyme, welche in die Translation eingreifen. Sie verursachen eine irreversible Inaktivierung von eukaryontischen Ribosomen durch Abspaltung von einem oder mehreren Adenin-Resten der 28S-rRNA oder sie depurinieren andere Polynukleotide (Stirpe *et al.*, 2006; Barbieri *et al.*, 1997). Die natürliche Rolle der RIPs ist bis heute nicht vollständig geklärt. Sie werden in der Medizin beispielsweise wegen ihrer antiviralen Aktivität und antifungalen Aktivität eingesetzt (Leads *et al.*, 1991; Huang *et al.*, 1992). Des Weiteren werden sie zur Herstellung von Immunotoxinen (siehe Kap. 1.2) als Toxinkomponenten eingesetzt, um Zellen selektiv abzutöten (Stirpe *et al.*, 2006).

Die RIPs werden in drei Klassen unterteilt, Typ I RIPs (z. B. Gelonin), Typ II RIPs (z. B. Ricin) und Typ III RIPs (z. B. b-32), und unterscheiden sich in ihrer Toxizität. Die Typ I RIPs sind Einzelkettenproteine mit einer molekularen Masse von etwa 30 kDa, die nur aus der enzymatischen Polypeptidkette (A-Kette), die für die Toxizität verantwortlich ist, bestehen. Sie sind gegenüber intakten Zellen nicht toxisch, da sie nicht selbstständig in die Zellen eindringen können. Innerhalb der Zelle können sie ihre toxische Wirkung aber entfalten und sie abtöten. Die Typ II RIPs bestehen aus zwei Polypeptidketten, der A- und B-Kette, die über Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind und eine molekulare Masse von etwa 35 kDa haben. Sie besitzen eine hohe Toxizität, da sie durch ihre zusätzliche lectinartige Polypeptidkette (B-Kette), die eine Bindungsstelle für Galaktose besitzt, an Zellen binden können. Dadurch werden sie in die Zelle aufgenommen und entfalten dort auf Grund ihrer A-Kette ihre Toxizität (Stirpe *et al.*, 2006; Li, 2002). Die Typ III RIPs sind inaktive Formen von RIPs, die durch Entfernen von kleinen Peptidsequenzen in eine aktive Form umgewandelt werden können (Walsh *et al.*, 1991).

Die RIPs zeigen unterschiedliche Wirkmechanismen, so gehören Ricin und verwandte RIPs zu den Polynukleotid-Adenosin-Glykosidasen (PNAG). Sie spalten hydrolytisch eine N-glykosidische Bindung eines Adenin-Rests (A4324) der 28S-rRNA der 60S-Untereinheit eukaryontischer Ribosomen und inhibieren so die Translation irreversibel (Endo *et al.*, 1987).

1.2.2.2 Gelonin

Gelonin ist ein Glykoprotein von 30 kDa, das in den Samen der indischen Pflanze *Gelonium multiflorum* (Wolfsmilchgewächs) vorkommt und erstmals von Stirpe (Stirpe *et al.*, 1980) isoliert wurde. Es gehört zu den Ribosomen-inaktivierenden Proteinen vom Typ I, das bedeutet, es besitzt nur die A-Kette und kann nicht in die Zelle gelangen. Deshalb ist es nicht toxisch für intakte Zellen, besitzt aber in der Zelle eine ähnliche biologische Aktivität wie Ricin. Außerdem ist Gelonin sehr stabil und behält auch nach Behandlung mit Proteasen, Detergentien, Harnstoff, Säure oder Alkali seine biologische Aktivität (Naturwissenschaften, 1980). Es eignet sich also gut für die Herstellung von Immunotoxinen, die z. B. in der Therapie von Autoimmunerkrankungen (Urbatsch *et al.*, 1993; Hossann *et al.*, 2006) oder in der Krebstherapie (Pirie *et al.*, 2011), von Bedeutung sein könnten.

Gelonin kann nicht nur aus den Samen von *Gelonium multiflorum* isoliert werden, sondern auch rekombinant durch Expression in *E. coli*. Das rekombinante Gelonin (rGel) ist die nicht glykosylierte Form von Gelonin und besitzt weitgehend die gleichen Eigenschaften wie natürliches Gelonin (nGel). Es hat aber im Vergleich zu nGel den Vorteil, dass es einen Affinitätsanker (His-Tag) tragen kann und somit die Aufreinigung der Immunotoxine erleichtert wird. Außerdem ist es auf Grund der fehlenden Glykosylierung weniger immunogen (Nolan *et al.*, 1993; Hossann *et al.*, 2006).

1.3 Kopplungsreaktionen

Bei der Herstellung von Immunotoxinen muss berücksichtigt werden, dass die Bindung *in vivo* extrazellulär stabil sein muss, um eine Abspaltung des Toxins zu verhindern. Gleichzeitig sollte die Bindung aber auch so labil sein, dass die Toxinkomponente innerhalb der Zelle abgespalten werden kann. Dementsprechend sollte das Kopplungsreagenz ausgesucht werden (Schäfer, 1995). Zur Kopplung von zwei Proteinen stehen verschiedene Reagenzien, sogenannte Linkermoleküle, zur Verfügung. Es gibt homo- und heterobifunktionelle Kopplungsreagenzien. Die Unterscheidung erfolgt je nachdem, ob ein Linkermolekül zwei gleiche oder zwei unterschiedliche funktionelle Gruppen besitzt. Die in Abbildung 1.7 dargestellten Reagenzien werden häufig bei der Herstellung von Immunotoxinen eingesetzt.

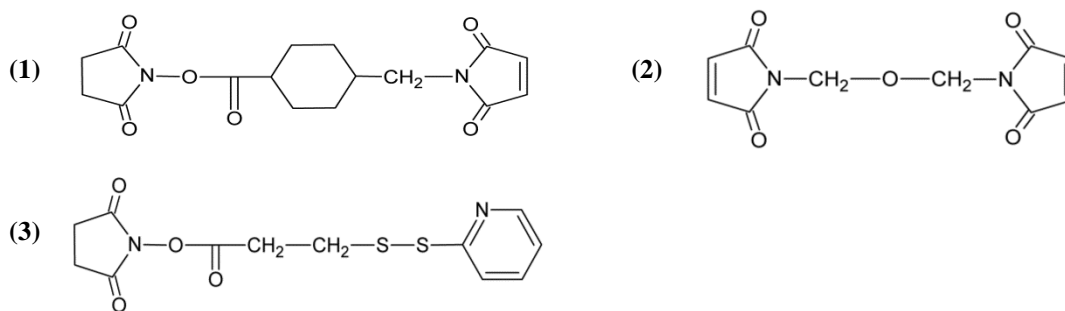


Abbildung 1.7: Häufig eingesetzte Kopplungsreagenzien: (1) N-Succinimidyl-4-(N'-maleimidomethyl)-cyclohexan-1-carboxylat (SMCC), (2) Bis-(maleimido)-methylether (BMME), (3) N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)-propionat (SPDP)

1. Einleitung

Der Einsatz von SPDP (Carlsson *et al.*, 1978) zur Kopplung führt zur Verknüpfung der Proteine über eine Disulfidbrücke. Diese Bindung ist *in vivo* instabil und kann durch Reduktion vor Erreichen der Zielzelle gespalten werden. Deshalb werden Disulfidbrücken durch Einsatz von sterisch aufwändigen Gruppen geschützt und stabilisiert (Vitetta *et al.*, 1991; Ghetie *et al.*, 1991). Intrazellulär wird die Bindung aber leicht gespalten. Beim Einsatz der Kopplungsreagenzien SMCC (Yoshitake *et al.*, 1979) oder BMME (Weston *et al.*, 1980) kommt es zur Ausbildung von Thioetherbrücken zwischen den Proteinen. Diese Bindung ist stabil gegen Reduktion, dadurch gelangen die Proteine *in vivo* zu den Zielzellen, ohne vorher abgebaut zu werden. Intrazellulär ist ein Abbau aber möglich, da die Maleimide bei pH-Werten kleiner 6, wie sie in den Endosomen vorliegen, durch ihre Ringspannung und Nachbargruppeneffekte hydrolysiert werden (Kreilinger, 2001). Die Proteine, die keine freien Thiolgruppen besitzen, werden vor der Kopplung mit Dithiopyridinen oder Maleimiden mit 2-Iminothiolan modifiziert (Jue *et al.*, 1978). Hierbei handelt es sich um eine sehr schonende Methode, weil die Nettoladung der Proteine erhalten bleibt und die Eigenschaften der Proteine, z. B. die Toxizität von Gelonin, nicht beeinflusst werden (Hunter *et al.*, 1972).

Beim Einsatz von SMCC als Kopplungsreagenz erfolgt eine Ladungsänderung am Gelonin oder am Antikörper, da hier ein Säureamid entsteht, das unter natürlichen Bedingungen nicht mehr protoniert werden kann. Dies führt im Falle des Gelonins zu einem Verlust der Toxizität (Brust *et al.*, 1987) und evtl. zur Proteinaggregation (Burk, 1990). Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit BMME eingesetzt, was den Vorteil hat, dass in beide Proteine mit 2-Iminothiolan Thiolgruppen eingeführt werden und somit ihre Ladung unverändert bleibt. In Abbildung 1.8 ist das Reaktionsschema zur Herstellung des anti-PD-1-Gelonin-Konjugats dargestellt.

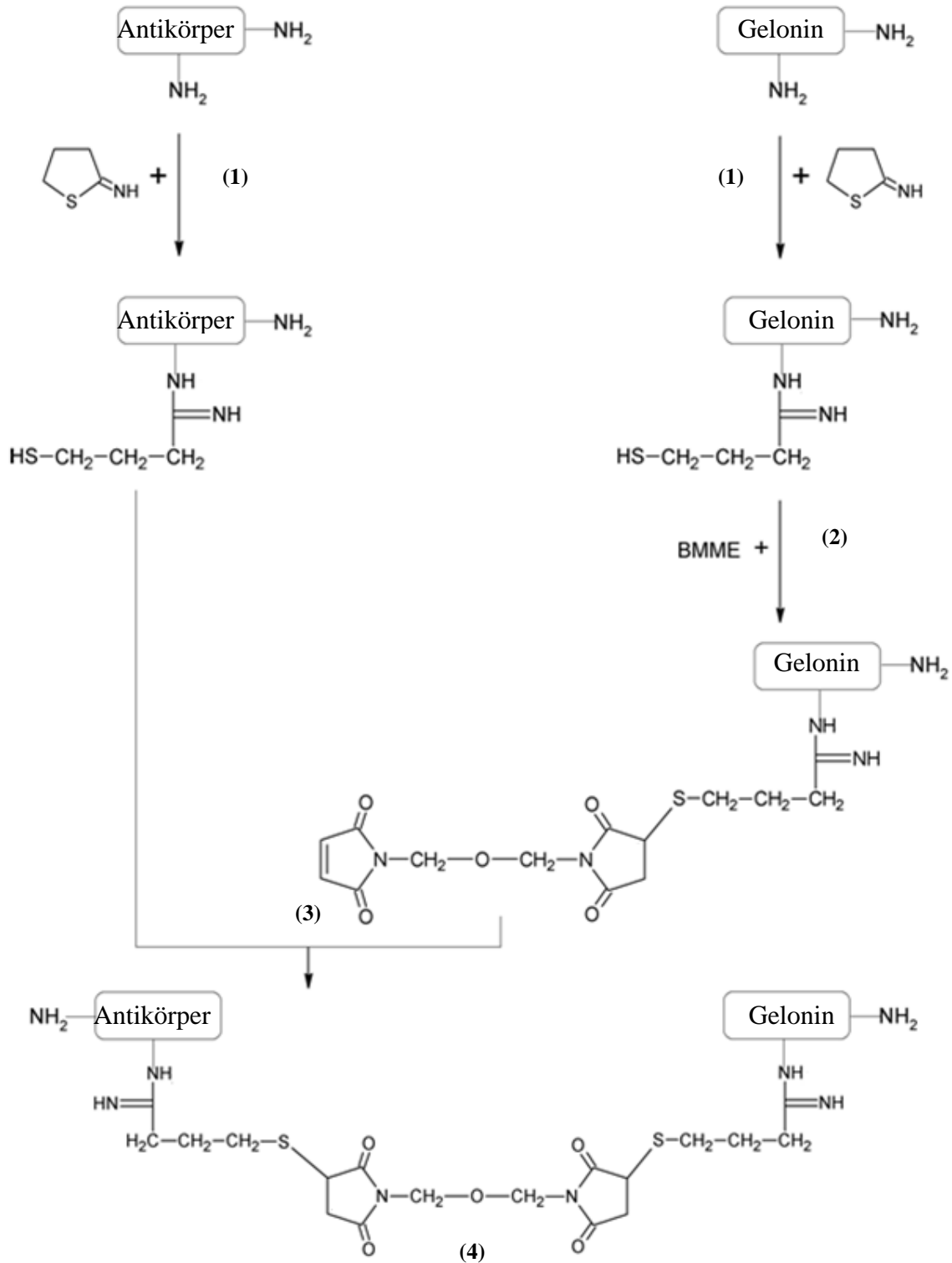


Abbildung 1.8: Reaktionsschema zur Herstellung des anti-PD-1-Gelolin-Konjugats: (1) Der Antikörper und Gelonin werden zunächst durch Zugabe von 2-Iminothiolan mit Thiolgruppen modifiziert. (2) Das modifizierte Gelonin wird durch Zugabe von BMME mit Maleimidgruppen modifiziert. (3) Das maleimid-modifizierte Gelonin reagiert mit dem thiolmodifizierten Antikörper zum gewünschten Konjugat (4) (Kreilinger, 2001).

2. Problemstellung

Wie zuvor beschrieben, sind Immunotoxine von großem Interesse in der pharmazeutischen Forschung und Entwicklung. In einer Kooperation mit Dr. Jose-Ignacio Rodriguez-Barbosa (Institut für Biomedizin (IBIOMED), Fachrichtung Immunologie, León, Spanien) sollte im Rahmen dieser Arbeit ein Immunotoxin entwickelt werden, das in der Transplantationsmedizin eingesetzt werden könnte. Als Toxinkomponente kommt hierbei Gelonin, das als erstes von Stirpe (Stirpe *et al.*, 1980) aus den Samen der indischen Pflanze *Gelonium multiflorum* isoliert wurde, in Frage. Gelonin ist ein wirksames Ribosomen-inaktivierendes Protein vom Typ I, das nicht in intakte Zellen gelangen kann und daher für diese nicht toxisch ist. Innerhalb der Zelle kann es seine biologische Aktivität aber entfalten. Um es in die Zelle zu bringen, wird eine Ligandenkomponente benötigt (Thorpe *et al.*, 1981; Descotes *et al.*, 1985). Der monoklonale anti-PD-1-Antikörper, der von Dr. Rodriguez-Barbosa zur Verfügung gestellt wurde, diente im Rahmen dieser Arbeit als Ligandenkomponente. Hierbei handelt es sich um einen Antikörper, der an PD-1 auf der Oberfläche von aktivierten alloreaktiven T-Zellen bindet (Agata *et al.*, 1996; Del Rio *et al.*, 2005). Mit Hilfe des anti-PD-1-Antikörpers könnte Gelonin nach dem in Abbildung 1.6 dargestellten möglichen Mechanismus in diese Zellen gelangen und sie selektiv zerstören, bevor sie zur Abstoßung des Transplantats führen.

Um die beiden Komponenten mittels chemischer Kopplung miteinander zu verbinden, konnte eine Vorschrift von Kreilinger (Kreilinger, 2001) modifiziert und das in Abbildung 1.8 dargestellte Kopplungsschema aufgestellt werden. Hierbei erfolgt zunächst eine Modifizierung von Gelonin (entweder natürliches Gelonin oder rekombinantes Gelonin) und dem anti-PD-1-Antikörper (verschiedene Klone) mit 2-Iminoethanol, um freie Thiolgruppen in die Proteine einzuführen. Nach der weiteren Modifizierung von Gelonin mit Bis-(maleimido)-methylether zur Einführung von Maleimidgruppen schließt sich die Kopplung der beiden Proteine durch die Reaktion der Thiolgruppe des anti-PD-1-Antikörpers mit der Maleimidgruppe des Gelonins an. Da die Reinheit des entstandenen anti-PD-1-Gelonin-Konjugats von großer Bedeutung für den Einsatz in weiteren Versuchen ist, erschien es notwendig, die nicht umgesetzten Edukte aus der Reaktionslösung zu entfernen. Dies sollte mit Hilfe von chromatographischen Auftrennungsmethoden wie HPLC, ÄKTA und Affinitätschromatographie durchgeführt werden. Für die Charakterisierung des Konjugats vor und nach der

2. Problemstellung

Aufreinigung kamen SDS-PAGE sowie die immunologischen Methoden Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Western-Blot und Durchflusszytometrie zum Einsatz.

Um eine bessere Charakterisierung und Aufreinigung des Konjugats zu ermöglichen, war ein weiteres Ziel dieser Arbeit die Herstellung eines monoklonalen anti-Gelonin-Antikörpers. Hierzu sollten BALB/c Mäuse mit rekombinantem Gelonin (rGel) immunisiert und nach erfolgreicher Immunisierung die Milz entnommen werden. Anschließend war geplant die Milzzellen nach einer Vorschrift von Moldenhauer (Moldenhauer, 2007) mit der Myelomzelllinie (X63Ag8.653) zu fusionieren, die entstandenen Hybridomzellen mehrfach zu klonieren, zu vermehren und den erhaltenen Antikörper mittels Protein-G-Affinitätschromatographie zu isolieren. Nach der Charakterisierung mittels ELISA und Western-Blot sollte der Antikörper sowohl zur Charakterisierung als auch zur Aufreinigung des Konjugats über eine Affinitätsäule eingesetzt werden.

Zum Abschluss der Arbeit war vorgesehen das fertige Konjugat zunächst auf seine Toxizität zu überprüfen, hierzu eignete sich ein *in-vitro*-Translationsassay. Während des Aufenthaltes am Institut für Biomedizin (León, Spanien) sollten unter der Anleitung von Dr. Rodriguez-Barbosa, *in-vitro*-Versuche zur Bestimmung der Aktivität und Spezifität des Konjugats mit PD-1-transfizierten HEK293T Zellen und mittels Durchflusszytometrie ausgeführt werden. Abschließend erschien es sinnvoll *in-vivo*-Versuche in einem Mausmodell für Hauttransplantationen durchzuführen.

3. Eigene Ergebnisse und Diskussion

3.1 Herstellung, Aufreinigung, Charakterisierung und Untersuchungen zur Wirkung des anti-PD-1-Gelonin-Konjugats

Die Herstellung des Immunotoxins aus dem Ribosomen-inaktivierenden Protein Gelonin (Toxinkomponente) und dem monoklonalen anti-PD-1-Antikörper (Ligandenkomponente) erfolgte nach der Isolierung der Komponenten durch chemische Kopplung nach dem Kopplungsschema in Abbildung 1.8. Für die Modifizierungen und die Kopplung wurde eine Vorschrift von Kreilinger (Kreilinger, 2001) verwendet. Nach der Kopplungsreaktion wurde das Konjugat mittels chromatographischer Methoden aufgereinigt, um nicht umgesetzte Edukte zu entfernen, die eine Beeinträchtigung der Wirkung und der Charakterisierung verursachen könnten. Die Charakterisierung des Konjugats wurde anschließend mittels SDS-PAGE, ELISA, Western-Blot und Durchflusszytometrie durchgeführt. Zur Untersuchung der Wirksamkeit des Konjugats wurde die Toxizität mittels des *in-vitro*-Translationsassay untersucht und im Rahmen des Aufenthaltes am IBIOMED wurden auch *in-vitro*-Versuche zur Bestimmung der Aktivität und Spezifität mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Abschließend sollten *in-vivo*-Versuche in einem Mausmodell für Hauttransplantationen mit dem Konjugat ausgeführt werden. In diesem Kapitel sind alle Ergebnisse zur Herstellung, Aufreinigung, Charakterisierung und Untersuchung der Wirkung des Konjugats aufgeführt.

3.1.1 Isolierung der Proteinkomponenten

Zur Herstellung des anti-PD-1-Gelonin-Konjugats wurden zuerst die benötigten Proteinkomponenten isoliert. Es wurden sowohl natürliches (siehe Kap. 3.1.1.1) als auch rekombinantes Gelonin (siehe Kap. 3.1.1.2) isoliert und für die Kopplungsreaktion eingesetzt. Der anti-PD-1-Antikörper wurde unter Anleitung von Dr. Rodriguez-Barbosa während des Aufenthaltes am IBIOMED isoliert (siehe Kap. 3.1.1.3) und für die Herstellung des Konjugats eingesetzt.

3.1.1.1 Isolierung und Charakterisierung von Gelonin aus den Samen von *Gelonium multiflorum*

Das 30 kDa schwere Glykoprotein Gelonin wurde bei der Herstellung des anti-PD-1-Gelonin-Konjugats als Toxin-Komponente eingesetzt. Es wurde nach einer modifizierten Vorschrift von Stirpe (Stirpe *et al.*, 1980) aus den Samen der indischen Pflanze *Gelonium multiflorum* isoliert. Die genaue Versuchsdurchführung ist in Kap. 5.5.1 beschrieben.

Es wurden 23 g Samen geschält, zerkleinert und das entstandene Homogenisat über Nacht gerührt. Die groben Gewebestücke wurden abfiltriert und das Filtrat zentrifugiert. Das Fett wurde abgeschöpft und der Überstand dialysiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand auf eine Kationenaustauschersäule aufgetragen und das gebundene Gelonin mittels Anlegen eines NaCl-Gradienten (0-0,3 M NaCl) bei einer NaCl-Konzentration von 0,1-0,2 M eluiert. Die Fraktionen wurden gesammelt und mit Hilfe des Chromatogramms (hier nicht gezeigt) zugeordnet. Insgesamt wurden 4-mal 50 ml Eluat gesammelt und mittels eines VIVASPIN-20-Konzentrators (Ausschlussgrenze 10 kDa) aufkonzentriert und charakterisiert.

3.1.1.1.1 Charakterisierung von natürlichem Gelonin (nGel)

Zur Charakterisierung erfolgte eine Konzentrationsbestimmung mit Hilfe des BCA-Tests (siehe Kap. 5.2.1.2). Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.1 aufgeführt:

Tabelle 3.1: Ergebnisse des BCA-Tests nach dem Aufkonzentrieren

Fraktion	Volumen [ml]	Konzentration [mg/ml]	Masse [mg]
1	10,5	0,3	2,7
2	8,3	0,9	7,5
3	7,0	1,2	8,7
4	3,5	0,6	2,0

Aus 23 g Samen wurden 20,9 mg natürliches Gelonin isoliert. Zur weiteren Charakterisierung und Reinheitskontrolle wurde eine SDS-PAGE (siehe Kap. 5.2.2) der Fraktionen 1-3 durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.1 dargestellt:

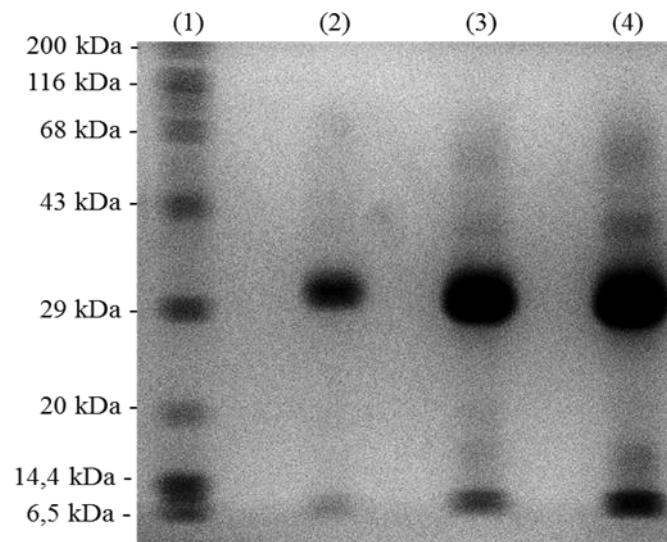


Abbildung 3.1: SDS-PAGE (12%iges Trenngel) der isolierten Geloninfraktionen: Bahn (1): Proteinmarker; Bahn (2): Geloninfraktion 1 (4 µg); Bahn (3): Geloninfraktion 2 (14 µg); Bahn (4): Geloninfraktion 3 (19 µg)

In den Bahnen 2-4 des Gels ist die in der Literatur (Stirpe *et al.*, 1980) für Gelonin angegebene charakteristische Bande bei ca. 30 kDa sichtbar. Außerdem sind in allen 3 Bahnen noch weitere Banden zu sehen, hierbei handelt es sich vermutlich um Verunreinigungen.

3.1.1.1.2 Diskussion

Aus 23 g Samen der Pflanze *Gelonium multiflorum* wurden 20,9 mg natürliches Gelonin (nGel) isoliert. Dies wurde mit Hilfe eines SDS-Gels bestätigt, da hier in allen Fraktionen die charakteristische Bande bei ca. 30 kDa sichtbar war. In den Fraktionen sind noch Verunreinigungen enthalten. Das isolierte Gelonin wurde ohne weitere Aufreinigung für die Kopplungsversuche eingesetzt.

3.1.1.2 Isolierung von rekombinantem Gelonin aus *E. coli*

Mit Hilfe der Gentechnik ist es möglich, große Mengen rekombinante Proteine aus Bakterien wie z. B. *E. coli* zu isolieren. Dies wird ermöglicht durch den Einbau von Plasmiden (ringförmige oder lineare doppelsträngige DNA), welche die Gensequenzen für das gewünschte Protein enthalten, mittels Transformation (siehe Kap. 5.5.2.3) in kompetente *E.-coli*-Zellen (Clark und Pazdernik 2009; Brock 2009).

Die DNA-Sequenz von Gelonin war in unserer Arbeitsgruppe bereits in dem Plasmid pET-gel (Plasmidkarte siehe Abb. 6.3 und Aminosäuresequenz siehe Kap. 6.2) vorhanden. Des Weiteren enthält das Plasmid eine Kanamycinresistenz zur Selektion von anderen Mikroorganismen, ein *lac*-Operon zur Induktion der Proteinsynthese durch Zugabe von IPTG und eine Sequenz für einen poly-Histidin-Tag (His-Tag) am N-Terminus des Proteins. Durch den His-Tag ist eine einfache und effiziente Isolierung von rekombinantem Gelonin (rGel) über die Nickelaffinitätschromatographie (siehe Kap. 5.2.6.1) möglich. Der Einsatz von His₆^T-Gelonin₁₋₂₅₁ könnte auf Grund des His-Tags auch die Aufreinigung des anti-PD-1-Gelonin-Konjugats erleichtern, wenn es hier als Toxin Komponente eingesetzt wird. Außerdem ist es im Gegensatz zu natürlichem Gelonin nicht glykosyliert und somit weniger immunogen (Hossann *et al.*, 2006). Die Isolierung erfolgte nach einer modifizierten Vorschrift von Hossann (Hossann, 2004) und ist in Kapitel 5.5.2 beschrieben.

Ausgehend von einer Glycerinkultur (BL21 (DE3)), in die das Plasmid (pET-Gel) transformiert war, wurden die Zellen auf kanamycinhaltige Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Mit je einer gewachsenen Kolonie wurden vier Übernachtskulturen angeimpft und inkubiert. Um eine ausreichende Proteinmenge zu erhalten, wurden ausgehend von den Übernachtskulturen vier Großkulturen inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ zwischen 0,7 und 1,0 bei 37 °C inkubiert. An diesem Punkt wurde die Proteinexpression durch Zugabe von IPTG gestartet und die Kulturen bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase weiter bei 37 °C inkubiert. Nach Stoppen der Expression auf Eis wurden die Zellen durch Zentrifugation abgeerntet und mittels Ultraschall lysiert. Das Gelonin wurde aus dem Überstand mit Hilfe der Nickelaffinitätschromatographie isoliert. Hierzu wurde der Proteinüberstand auf die Säule aufgetragen und das über den His-Tag an die Säule gebundene Gelonin mit einem Imidazolgradienten von der Säule eluiert. Während der Isolierung wurden alle Fraktionen gesammelt und dem Chromatogramm (hier nicht gezeigt) zugeordnet. Zur Entfernung von Imidazol wurden die Gelonin enthaltenden Fraktionen dialysiert und charakterisiert.

3.1.1.2.1 Charakterisierung von His₆^T-Gelonin₁₋₂₅₁

Zur Charakterisierung wurden eine SDS-PAGE (siehe Kap. 5.2.2), ein ELISA (siehe Kap. 5.4.1) und ein Western-Blot (siehe Kap. 5.4.2) der einzelnen Fraktionen durchgeführt. Die Ergebnisse der SDS-PAGE einer Isolierung sind exemplarisch in Abbildung 3.2 dargestellt.

3. Eigene Ergebnisse und Diskussion

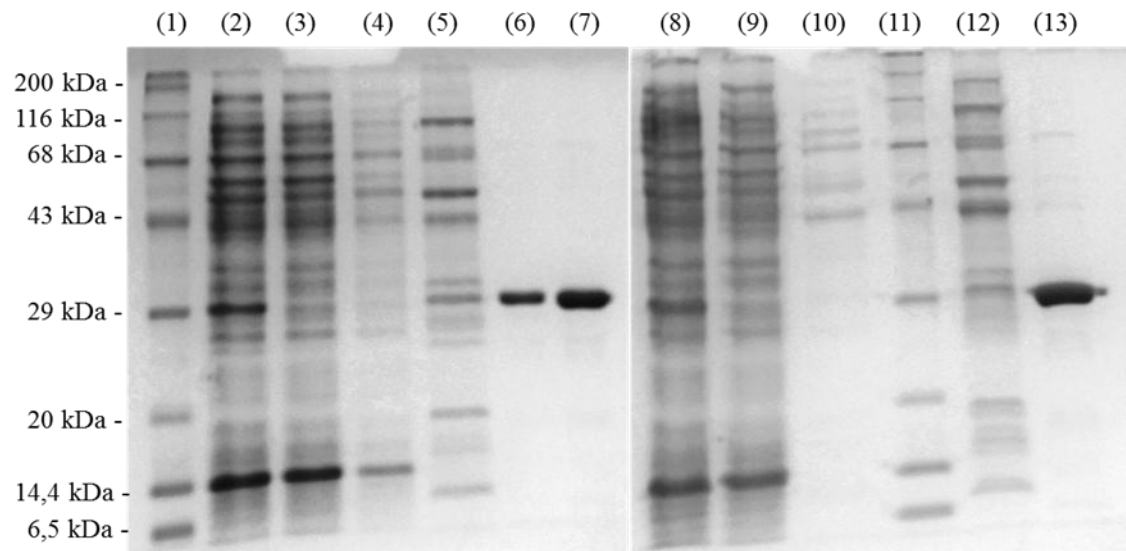


Abbildung 3.2: SDS-PAGE (12%iges Trenngel) der aufgesammelten Fraktionen während der Nickelaffinitätschromatographie: In Bahn 2-7 sind die Ergebnisse des Proteinüberstands 1 dargestellt. Bahn (1): Proteinmarker; Bahn (2): Proteinüberstand 1 (Lysat 1, 5 μ l); Bahn (3): Lysat nach dem Durchlaufen der Säule (10 μ l); Bahn (4): Bindungspufferfraktion (10 μ l); Bahn (5): Waschfraktion 1 (WF 1, 10 μ l); Bahn (6): Waschfraktion 2 (WF 2, 10 μ l); Bahn (7): Elutionsfraktion (10 μ l); In den Bahnen 8-13 sind die Ergebnisse des Proteinüberstandes 2 dargestellt. Bahn (8): Lysat 2 (5 μ l); Bahn (9): Lysat nach dem Durchlaufen der Säule (10 μ l); Bahn (10): Bindungspufferfraktion (10 μ l); Bahn (11): Proteinmarker; Bahn (12): Waschfraktion (10 μ l); Bahn (13): Elutionsfraktion (10 μ l).

Der in Bahn 2-7 dargestellte Verlauf der Geloninisolierung aus dem 1. Proteinüberstand zeigt, dass im Lysat 1 (Bahn 2) die für rGel charakteristische Bande bei ca. 29 kDa (Hossann *et al.*, 2006) zu sehen ist. Nach der Bindung an die Säule (Bahn 3) ist bei 29 kDa nur noch eine schwache Bande zu erkennen, dies spricht dafür, dass Gelonin fast vollständig an die Säule gebunden hat. Durch Spülen mit Bindungspuffer (Bahn 4) wurde nur wenig Gelonin von der Säule gelöst, da hier die Bande sehr schwach ist. In Bahn 5 ist zu sehen, dass schon etwas Gelonin in der Waschfraktion 1 bei 100 mM Imidazol eluiert und in Waschfraktion 2 (Bahn 6) befindet sich ebenfalls Gelonin. Allerdings ist das Gelonin in WF 2 im Vergleich zu WF 1 rein. In der Elutionsfraktion bei 500 mM Imidazol ist auch reines Gelonin enthalten. In Bahn 8-13 ist der Verlauf der Geloninisolierung des 2. Proteinüberstands dargestellt. Hier ist der Verlauf ähnlich wie bei Überstand 1 und der größte Anteil von reinem Gelonin ist auch in der Elutionsfraktion (Bahn 13) enthalten.

Zur weiteren Charakterisierung wurden alle Fraktionen, die im Gel Geloninbanden zeigten, in einem ELISA weiter untersucht. Hierzu wurde eine ELISA-Platte mit einer Konzentration der Proteine von 20 μ g/Well gecoatet und mit Antikörpern detektiert. Als Primärantikörper diente ein Maus-anti-poly-Histidin (Verdünnung 1:1000) und als Sekundärantikörper ein anti-Maus-

3. Eigene Ergebnisse und Diskussion

IgG-AP (F_c -spezifisch) (Verdünnung 1:1000). Für den Western-Blot wurden alle Fraktionen der Geloninisolierung des Proteinüberstandes 2 in einer Konzentration von 100 μ g einer SDS-PAGE (12%iges Trenngel) unterzogen und im Anschluss auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Zur Detektion wurden die gleichen Antikörper wie für den ELISA eingesetzt. Die Ergebnisse des ELISA und des Western-Blots einer Isolierung sind exemplarisch in Abbildung 3.3 dargestellt.

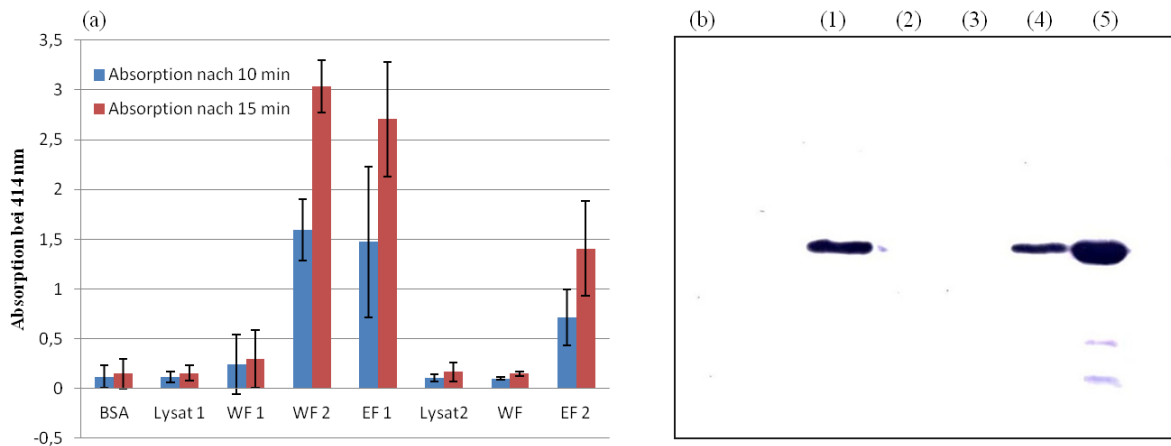


Abbildung 3.3: Immunologische Charakterisierung der Geloninfraktionen mittels (a) ELISA und (b) Western-Blot: (a) Ergebnisse des ELISA aller Gelonin enthaltenden Fraktionen durch Bestimmung der Absorption bei 414 nm nach 10 und 15 min (b) Ergebnisse des Western-Blots der Isolierung des Proteinüberstandes 2: Bahn (1): Lysat; Bahn (2): Lysat nach dem Durchlaufen der Säule; Bahn (3): Bindungspufferfraktion; Bahn (4): Waschfraktion; Bahn (5): Elutionsfraktion.

Das Ergebnis des ELISA zeigt, dass im Vergleich mit der Negativkontrolle (BSA) in der Waschfraktion 2 (WF 2), der Elutionsfraktion 1 (EF 1) und der Elutionsfraktion 2 (EF 2) eindeutig His₆^T-Gelonin₁₋₂₅₁ enthalten ist. Im Lysat 1 und 2 konnte Gelonin nicht nachgewiesen werden, der Grund hierfür ist, dass der Geloninanteil im Lysat durch andere enthaltene Proteine verdünnt wird und für einen positiven Nachweis nicht ausreicht. Die Waschfraktion 1 (WF 1) ist schwach positiv, das bedeutet, auch hier ist eine geringe Menge Gelonin enthalten. Der Western-Blot bestätigt ebenfalls das Ergebnis der SDS-PAGE (siehe Abb. 3.3). Im Lysat (Bahn 1), der Waschfraktion (Bahn 4) und der Elutionsfraktion (Bahn 5) ist die für rGel charakteristische Bande zu sehen. Die Elutionsfraktion enthält den größeren Anteil von rGel im Vergleich zur Waschfraktion. Die Charakterisierung bestätigt, dass His₆^T-Gelonin₁₋₂₅₁ erfolgreich aus *E. coli* isoliert werden konnte. Mittels BCA-Test (siehe Kap. 5.2.1.2) wurde nach der Aufkonzentration (siehe Kap. 5.2.4.1) die Konzentration und die Menge an rGel bestimmt, die isoliert werden konnte. Aus 2 l Bakterienkultur wurden durchschnittlich 0,5-4 mg rGel mit einer Konzentration von 0,2-1,5 mg/ml isoliert. Das erhaltene rGel wurde ohne

3. Eigene Ergebnisse und Diskussion

weitere Aufarbeitung zur Herstellung des anti-PD-1-Gelonin-Konjugats eingesetzt oder nach Abspaltung des His-Tags zur Immunisierung von Mäusen für die Herstellung des monoklonalen anti-Gelonin-Antikörpers verwendet.

3.1.1.2.2 Abspaltung des His-Tags von His₆^T-Gelonin₁₋₂₅₁

Bevor das rekombinante Gelonin zur Immunisierung von BALB/c Mäusen eingesetzt werden konnte, wurde der 6x His-Tag abgespalten. Hierzu besitzt das Plasmid pET-gel eine Schnittstelle für Thrombin, ein Enzym, das spezifisch an die Aminosäuresequenz LeuValProArgGlySer zwischen Gelonin und dem 6x His-Tag bindet und die Peptidbindung vor dem Glycin spaltet. Für die Thrombinspaltung (siehe Kap. 5.5.3.1) wurde Gelonin mit Thrombin (0,83 µl pro mg Gelonin) versetzt und über Nacht bei RT inkubiert. Zur Abtrennung des abgespaltenen 6x His-Tags von der Reaktionslösung wurde die Lösung in einem VIVASPIN-6-Konzentrator (Ausschlussgrenze 10 kDa) aufkonzentriert (siehe Kap. 5.2.4.1). Hier passiert bei der Zentrifugation der 6x His-Tag, der kleiner als der Porendurchmesser ist, die Membran und Gelonin wird zurückgehalten, weil es die Membran nicht durchdringen kann. Die Konzentration wurde mit dem BCA-Test (siehe Kap. 5.2.1.2) ermittelt. Es ergaben sich 0,8 mg gespaltenes rGel (c = 0,4 mg/ml). Mittels SDS-PAGE (siehe Kap. 5.2.2) wurde überprüft, ob die Abspaltung des 6x His-Tags erfolgreich war. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.4 dargestellt.

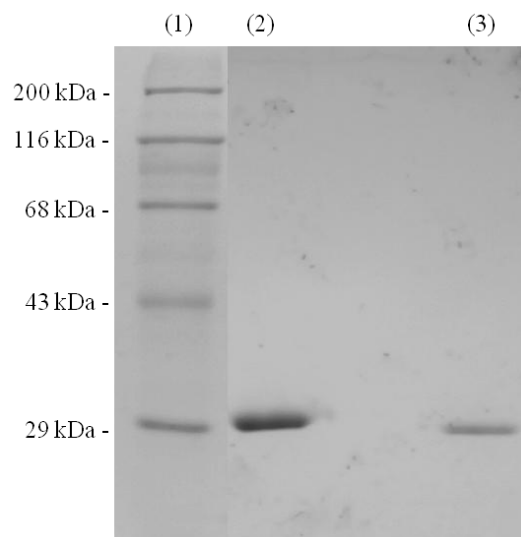


Abbildung 3.4: SDS-PAGE (12%iges Trenngel) der Thrombinspaltung: Bahn (1): Proteinmarker; Bahn (2): rGel vor der Spaltung mit Thrombin (10 µg); Bahn (3): rGel nach der Spaltung mit Thrombin (5 µg).

Das in Bahn (2) aufgetragene rGel vor der Spaltung zeigt die charakteristische Bande bei 29 kDa. Im Vergleich dazu zeigt die Bande von rGel nach der Spaltung in Bahn (3) einen geringen Massenverlust an. Dieser stimmt mit der Literatur überein, denn hier wurde ein Massenverlust von ca. 1,5 kDa ermittelt (Hossann, 2004). Die Thrombinspaltung war erfolgreich und das rGel konnte zur Immunisierung eingesetzt werden.

3.1.1.2.3 Diskussion

Die Charakterisierung zeigt, dass die Isolierung von rekombinantem Gelonin aus *E. coli* erfolgreich war. Es wurden durchschnittlich 0,5-4 mg rGel mit einer Konzentration von 0,2-1,5 mg/ml aus 2 l Bakterienkultur isoliert. Mittels SDS-PAGE wurde die für rGel charakteristische Bande bei 29 kDa identifiziert. Der größte Anteil befand sich in der Elutionsfraktion. Mit den immunologischen Methoden ELISA und Western-Blot wurde dieses Ergebnis noch einmal bestätigt. Denn im Western-Blot wurde die Bande bei 29 kDa ebenfalls detektiert und im ELISA wurde die Elutionsfraktion positiv auf rGel getestet. Ein Teil des Gelonins konnte für die Immunisierung von Mäusen zur Herstellung des anti-Gelonin-Antikörpers eingesetzt werden. Zuvor musste aber der His-Tag abgespalten werden. Hierzu wurde eine Thrombinspaltung durchgeführt. Mittels SDS-PAGE wurde nachgewiesen, dass die Abspaltung erfolgreich war, denn hier war ein geringer Massenverlust von ca. 1,5 kDa im Vergleich zu rGel auf dem Gel sichtbar. Der andere Teil von rGel konnte ohne weitere Aufarbeitung für die Konjugatherstellung eingesetzt werden.

3.1.1.3 Isolierung des anti-PD-1-Antikörpers

Der anti-PD-1-Antikörper (verschiedene Klone) diente bei der Herstellung des anti-PD-1-Gelonin-Konjugats als Ligandenkomponente und wurde sowohl aus der Aszitesflüssigkeit (Klon 4F10) als auch aus dem Zellkulturüberstand (Klon 1H10) mit Hilfe der Protein-G-Affinitätschromatographie (siehe Kap. 5.5.4) isoliert.

Der Zellkulturüberstand oder die Aszitesflüssigkeit wurden auf die äquilibrierte Protein-G-Säule gegeben und diese verschlossen. Nach vierstündiger Inkubation, nachdem der Überstand die Säule durchlaufen hatte, erfolgte die Elution bei pH 2,7. Zur sofortigen Neutralisierung wurden die Fraktionen in Gefäßen mit Neutralisierungspuffer (pH 9) gesammelt. Anschließend wurden die Fraktionen charakterisiert.

3.1.1.3.1 Charakterisierung des anti-PD-1-Antikörpers

Zur Charakterisierung der isolierten anti-PD-1-Antikörper wurden zunächst die Konzentrationen mittels Nano Drop (siehe Kap. 5.2.1.1) bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.2 aufgelistet.

Tabelle 3.2: Ergebnisse der Konzentrationsbestimmung der isolierten Antikörper mittels Nano Drop

Klon	Konzentration [mg/ml]	Menge [mg]	Volumen [ml]
1H10	2	11,5	5,7
4F10	2	16,9	8,4

Insgesamt wurden 11,5 mg des Klons 1H10 aus dem Zellkulturüberstand und 16,9 mg des Klons 4F10 aus der Aszitesflüssigkeit isoliert. Ob es sich bei den isolierten Antikörpern um anti-PD-1-Antikörper handelt, wurde mittels Durchflusszytometrie (siehe Kap. 5.4.3) bestimmt. Hierzu wurden nicht transfizierte HEK293T Zellen (Kontrolle) und mit PD-1 transfizierte HEK293T Zellen (siehe Kap. 3.1.5.1.1) eingesetzt. Die während der Messung aufgezeichneten Daten wurden mit der Software Win List 3D so bearbeitet, dass zunächst alle lebenden Zellen in der Graphik ausgewählt und in einen neuen Graphen geplottet wurden. Durch das sogenannte „Gating“ wurden die Anteile der Zellen in den einzelnen „Gates“ ermittelt. Der Anteil der Zellen in Gate 3 (links oben) gibt an wie viele Zellen positiv mit den eingesetzten Antikörpern reagieren. Die Ergebnisse für Klon 1H10 sind in Abbildung 3.5 und für Klon 4F10 in Abbildung 3.6 dargestellt.

Das Ergebnis zeigt, dass bei den mit PD-1 transfizierten Zellen ~ 65 % der lebenden Zellen positiv auf die Reaktion mit dem isolierten anti-PD-1-Antikörper (Klon 1H10) getestet wurden. Bei der Kontrolle mit den nicht transfizierten Zellen waren ~ 99 % der Zellen negativ. Somit handelt es sich bei dem isolierten Antikörper um einen anti-PD-1-Antikörper, da er an PD-1 bindet und so nachgewiesen werden kann. Auch für den anti-PD-1-Antikörper (Klon 4F10) wurde ein ähnliches Ergebnis wie für Klon 1H10 erhalten. Hier wurden ~ 99 % der lebenden Zellen bei der Kontrolle negativ auf die Reaktion mit dem anti-PD-1-Antikörper getestet und ~ 53 % der transfizierten Zellen positiv. Der Antikörper bindet also an PD-1 und es wurde nachgewiesen, dass es sich um einen anti-PD-1-Antikörper handelt. Somit war die

3. Eigene Ergebnisse und Diskussion

Isolierung des Antikörpers sowohl aus dem Zellkulturüberstand als auch aus der Aszitesflüssigkeit erfolgreich.

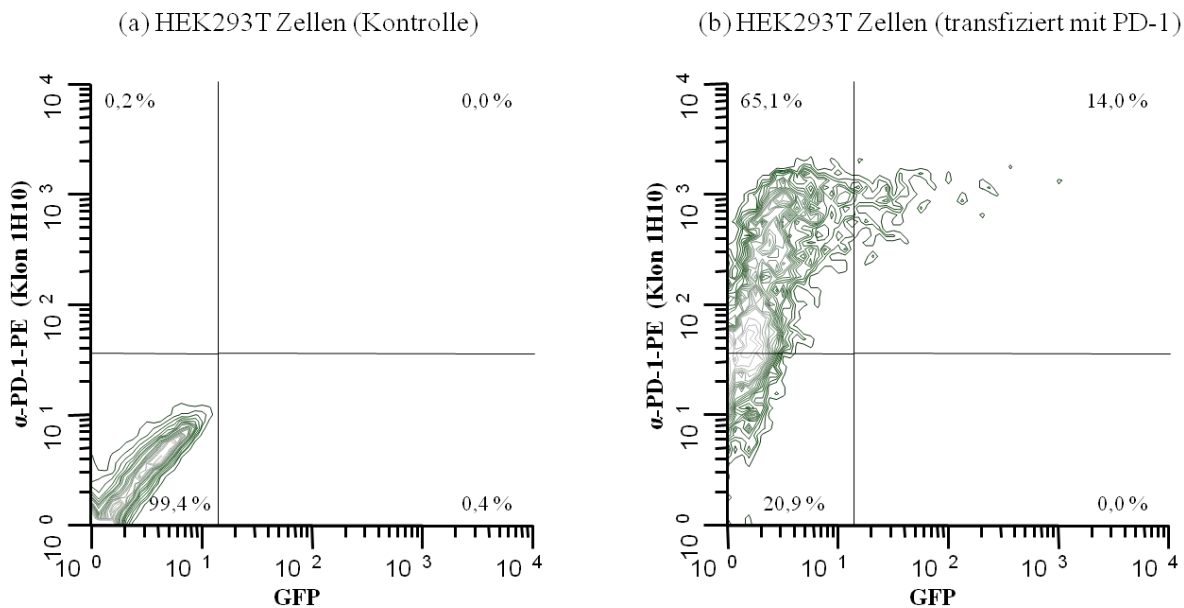


Abbildung 3.5: Ergebnis der Charakterisierung des anti-PD-1-Antikörpers (Klon 1H10) mittels Durchflusszytometrie: (a) Ergebnis der nicht transfizierten Zellen (500000 Zellen/Ansatz); (b) Ergebnis der transfizierten Zellen (500000 Zellen/Ansatz). Als Primärantikörper diente anti-PD-1 (Klon 1H10, 2 µg/ml) und als Sekundärantikörper wurde Maus-anti-Ratte-IgG_{2a}-Biotin (1 µg/ml) eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit SA-PE (Verdünnung 1/800). Die toten Zellen wurden durch Zugabe von Propidiumiodid detektiert.

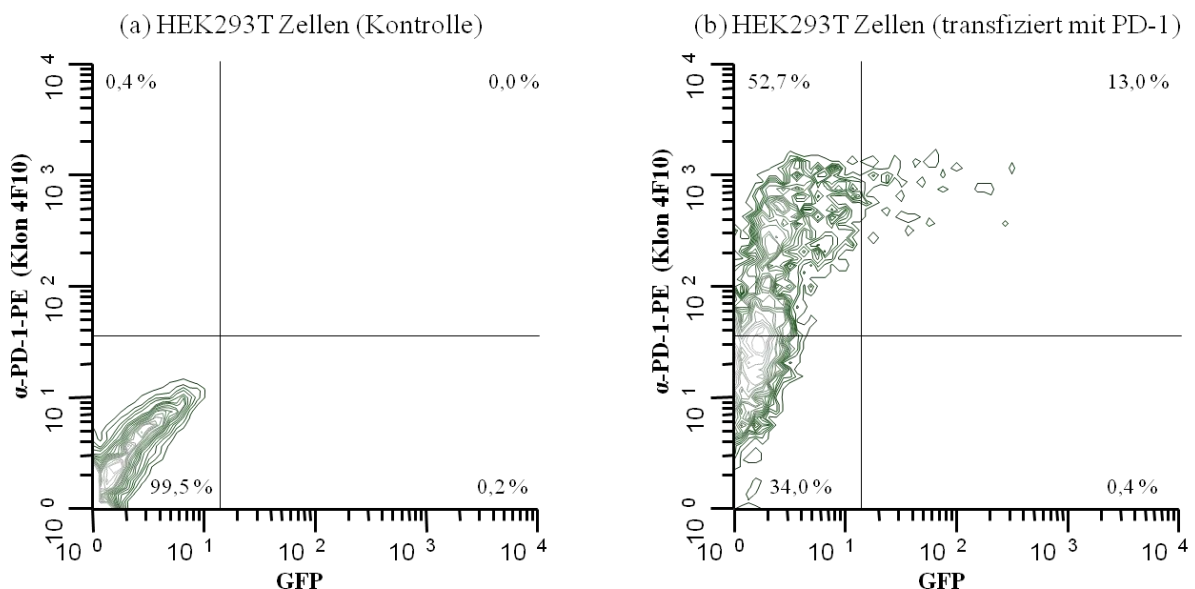


Abbildung 3.6: Ergebnis der Charakterisierung des anti-PD-1-Antikörpers (Klon 4F10) mittels Durchflusszytometrie: (a) Ergebnis der nicht transfizierten Zellen; (b) Ergebnis der transfizierten Zellen. Als Primärantikörper diente anti-PD-1 (Klon 4F10, 2 µg/ml) und als Sekundärantikörper wurde Maus-anti-Ratte-IgG_{2a}-Biotin (1 µg/ml) eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit SA-PE (Verdünnung 1/800). Die toten Zellen wurden durch Zugabe von Propidiumiodid detektiert.

3.1.1.3.2 Diskussion

Die Isolierung des anti-PD-1-Antikörpers war erfolgreich. Es konnten mittels Protein-G-Affinitätschromatographie 11,5 mg des Klons 1H10 aus dem Zellkulturüberstand und 16,9 mg des Klons 4F10 aus der Aszitesflüssigkeit isoliert werden. Die Charakterisierung der beiden isolierten Antikörperklone mittels Durchflusszytometrie bestätigte, dass es sich bei beiden Klonen um einen anti-PD-1-Antikörper handelt, da sie beide an PD-1 auf der Oberfläche der Zellen binden können. Die Antikörper wurden ohne weitere Aufarbeitung zur Herstellung des Konjugats eingesetzt.

3.1.2 Herstellung des anti-PD-1-Gelonin-Konjugats mit natürlichem Gelonin

Zur Herstellung des Konjugats wurde eine Vorschrift von Kreilinger (Kreilinger, 2001) modifiziert. Hierbei wurden die beiden Komponenten gemäß dem in Abbildung 1.8 dargestellten Reaktionsschema miteinander verbunden. Ein Vorteil des bei dieser Methode eingesetzten Kopplungsreagenzes Bis-(maleimido)-methylether (BMME) ist, dass durch die Ausbildung von Thioetherbrücken zwischen den Proteinen eine stabile Bindung entsteht, die extra-zellulär nicht gespalten werden kann. So kann das Konjugat, ohne vorher gespalten zu werden, in die Zelle gelangen. Intrazellulär ist auf Grund von pH-Werten kleiner 6 in den Endosomen eine Spaltung aber möglich. Die ersten Kopplungsversuche erfolgten mit natürlichem Gelonin und die genaue Durchführung ist in Kapitel 5.5.5 beschrieben.

3.1.2.1 Modifizierung mit 2-Iminothiolan

Da die beiden zu koppelnden Proteine Gelonin und anti-PD-1-Antikörper keine für die Reaktion mit BMME benötigten freien Thiolgruppen besitzen, müssen diese mit Hilfe von 2-Iminothiolan eingeführt werden (Jue *et al.*, 1978). Hierbei handelt es sich um eine schonende Methode, da die Aminogruppen beider Proteine in Amidine umgewandelt werden, die unter physiologischen Bedingungen auch protoniert sind. Das bedeutet, die Nettoladung der Proteine bleibt erhalten und die Eigenschaften, z. B. die Toxizität, werden wenig beeinflusst (Hunter *et al.*, 1972). Die Durchführung ist ausführlich in Kapitel 5.5.5.1 beschrieben.

3.1.2.1.1 Modifizierung von natürlichem Gelonin mit 2-Iminothiolan

Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an die Dissertation von Kreilinger (Kreilinger, 2001). Eine genaue Beschreibung des Versuchsablaufs ist in Kapitel 5.5.5.1 aufgeführt. Bei der Modifizierung ist zu beachten, dass alle Schritte unter Schutzgas stattfinden, um eine Oxidation der Thiolgruppen zu vermeiden. Außerdem wurden alle Glasgefäße silanisiert, um Proteinverluste zu minimieren. Die Geloninlösung (verschiedene Ansätze von 1,5-6 mg/ml) wurde mit einem 30 bzw. 60fach molaren Überschuss an 2-Iminothiolan versetzt und für 60 bzw. 90 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde nicht umgesetztes 2-Iminothiolan mittels Gelfiltrationschromatographie (siehe Kap. 5.2.6.3) über eine Sephadex-G-25-Säule abgetrennt. Das Chromatogramm zeigte für alle Ansätze ein ähnliches Ergebnis und ist in Abbildung 3.7 exemplarisch dargestellt.

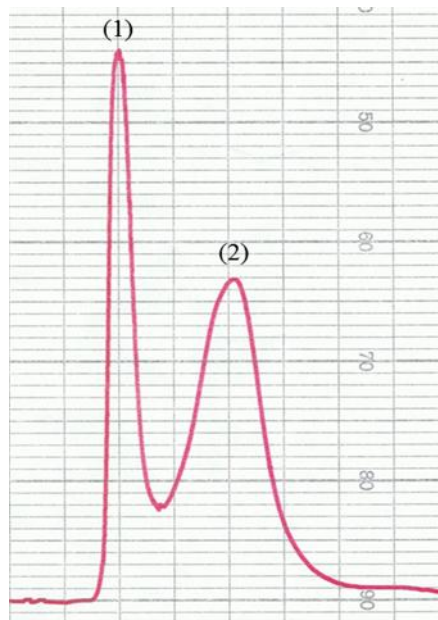


Abbildung 3.7: Chromatogramm der Gelfiltrationschromatographie des mit 2-Iminothiolan modifizierten natürlichen Gelonins: (1) Peak von Gelonin und thiolmodifiziertem Gelonin (Gelonin-SH); (2) Peak von nicht umgesetztem 2-Iminothiolan.

Das Ergebnis zeigt, dass nicht umgesetztes 2-Iminothiolan abgetrennt werden konnte. Eine Trennung von nicht modifiziertem Gelonin und thiolmodifiziertem Gelonin kann auf diesem Weg aber auf Grund des geringen Massenunterschieds nicht erfolgen. Die Anzahl der eingebauten Thiolgruppen pro Mol Gelonin wurde nach der Methode von Grassetti (Grassetti *et al.*, 1967) bestimmt. Die Durchführung erfolgte hierbei nach dem Schema von Rousselle (Rousselle, 1996) und ist in Kapitel 5.5.5.2 beschrieben. Die Ergebnisse der Bestimmung der Einbauraten und die unterschiedlichen Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 3.3 aufgelistet.

Tabelle 3.3: Durchschnittliche Einbauraten von Thiolgruppen in natürlichem Gelonin

Konzentration [mg/ml]	Inkubationszeit [min]	Molarer Überschuss 2-Iminothiolan	Durchschnittlicher Einbau pro Mol	Ausbeute [%]
6*	90	30	2,8-4,6	38-64
1,5-1,6*	60	60	1,3-1,6	40-86
1,6*	90	30	1,2-2,8	45-62

*) in dieser Zeile sind mehrere Ansätze zusammengefasst

Wie Brust (Brust *et al.*, 1987) zeigen konnte, bleibt bei einer Einbaurate von bis zu 2 Mol Thiolgruppen pro Mol Gelonin die biologische Aktivität weitestgehend erhalten. Bei den ersten Modifizierungsversuchen von Gelonin war der durchschnittliche Einbau von 2,8-4,6 Mol Thiolgruppen pro Mol Gelonin zu hoch und ein Aktivitätsverlust konnte nicht ausgeschlossen werden. Deshalb wurde die Reaktion durch die Änderung der eingesetzten Konzentration, der Inkubationszeit und des eingesetzten Überschusses optimiert. Das beste Ergebnis, das hierbei erzielt werden konnte, war eine durchschnittliche Einbaurate von 1,3-1,6 Mol Thiolgruppen pro Mol Gelonin bei einer Inkubationszeit von 60 min und einem 60fach molaren Überschuss. Hierbei wurde auch die höchste Ausbeute an thiolmodifiziertem Gelonin im Bereich von 40-86 % erreicht.

3.1.2.1.2 Modifizierung des anti-PD-1-Antikörpers mit 2-Iminothiolan

Da der anti-PD-1-Antikörper keine freien Thiolgruppen für die Reaktion mit BMME besitzt, wurde er auch mit 2-Iminothiolan modifiziert. Die Durchführung erfolgte analog zu der Modifizierung von Gelonin in Kapitel 3.1.2.1.1. Lediglich die Überschüsse, die Konzentrationen und die Inkubationszeiten wurden variiert (siehe Tab. 3.5). Zur Modifizierung wurden zwei unterschiedliche anti-PD-1-Antikörperklone (J43 und 4F10) eingesetzt. Dabei wurde der Klon J43 nur als Testantikörper eingesetzt. Eine Bestimmung der Größe der eingesetzten Antikörper von Schanz (Schanz, 2009) ergab die in Tabelle 3.4 aufgeführten Werte. Für den Klon 1H10 fand keine Größenbestimmung statt, da er noch nicht für die Kopplungsreaktionen eingesetzt wurde.

3. Eigene Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 3.4: Ergebnis der Größenbestimmung der anti-PD-1-Antikörper (Schanz, 2009)

Klon	Größe [kDa]	light chain [kDa]	heavy chain [kDa]
J43	190	29	66
4F10	170	27,5	57,5

Die Antikörperlösung (verschiedene Ansätze von 1-2 mg/ml) wurde mit dem angegebenen molaren Überschuss an 2-Iminoethanol für 60 bzw. 90 min bei 4 °C inkubiert. Die Abtrennung von nicht umgesetztem Reagenz erfolgte über eine Sephadex-G-25-Säule. In Abbildung 3.8 ist das Ergebnis der Gelfiltrationschromatographie von Klon J43 und Klon 4F10 exemplarisch für alle Ansätze dargestellt.

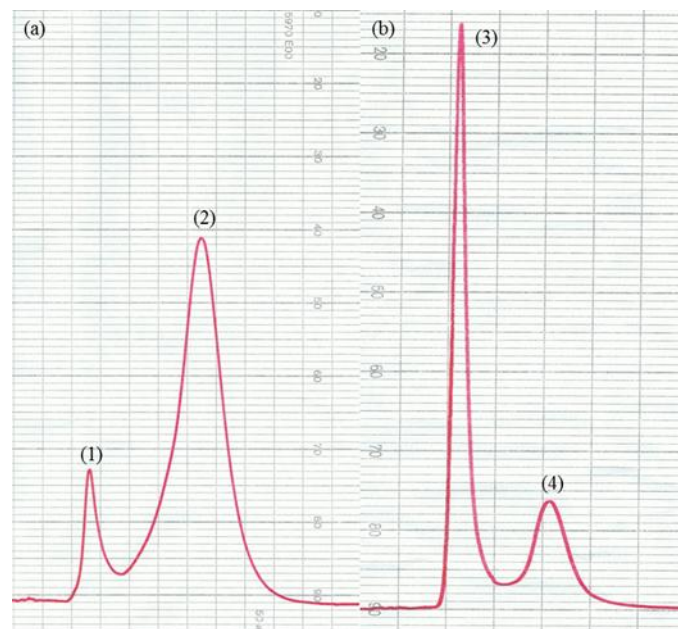


Abbildung 3.8: Chromatogramme der Gelfiltrationschromatographie des mit 2-Iminoethanol modifizierten anti-PD-1-Antikörpers: (a) Chromatogramm des anti-PD-1-Antikörpers (Klon J43): (1) anti-PD-1-Antikörper und thiolmodifizierter anti-PD-1-Antikörper (Ak-SH), (2) nicht umgesetztes 2-Iminoethanol; (b) Chromatogramm des anti-PD-1-Antikörpers (Klon 4F10): (3) anti-PD-1-Antikörper und thiolmodifizierter anti-PD-1-Antikörper (Ak-SH), (4) nicht umgesetztes 2-Iminoethanol.

Die Chromatogramme zeigen, dass die Abtrennung von nicht umgesetztem Reagenz für beide Klone erfolgreich war. Aber auch hier ist wie bei Gelonin eine Trennung von nicht modifiziertem Antikörper und modifiziertem Antikörper auf Grund des geringen Massenunterschieds nicht möglich. Die Bestimmung der Einbaurate erfolgte auch hier nach der Methode von Grassetti (Grassetti *et al.*, 1967) und dem Schema von Rousselle (Rousselle, 1996) (siehe

3. Eigene Ergebnisse und Diskussion

Kap. 5.5.5.2). Die Reaktionsbedingungen und die Ergebnisse für die Einbauraten sind in Tabelle 3.5 (Klon J43) und Tabelle 3.6 (Klon 4F10) aufgelistet.

Tabelle 3.5: Durchschnittliche Einbauraten von Thiolgruppen in den anti-PD-1-Antikörper (Klon J43)

Konzentration [mg/ml]	Inkubationszeit [min]	Molarer Überschuss 2-Iminothiolan	Durchschnittlicher Einbau pro Mol	Ausbeute [%]
1	90	80	8	46
1	60	80	0,8	87

Beim anti-PD-1-Antikörper war im Gegensatz zu Gelonin nicht bekannt, bis zu welcher Einbaurrate seine biologische Aktivität erhalten bleibt. In Anlehnung an frühere Arbeiten von Schäfer (Schäfer, 1990), der den Antikörper TÜK 3 an Gelonin koppelte, wurde aber auch von einer Einbaurrate von bis zu 2 Mol Thiolgruppen pro Mol Antikörper ausgegangen. Auch die molaren Überschüsse wurden auf Grund dieser Arbeit ausgewählt. Da bei der ersten Reaktion die Einbaurrate sehr hoch war, wurde für die nächste Reaktion die Reaktionszeit auf 60 min verkürzt. Das Ergebnis lag mit 0,8 Mol Thiolgruppen pro Mol Antikörper im gewünschten Bereich. Die durch den Testantikörper (Klon J43) gewonnen Erkenntnisse wurden auf die Reaktion mit Klon 4F10 übertragen. So wurde die Reaktionszeit auf 60 min eingestellt und der Überschuss erhöht, um die Einbaurrate noch etwas zu steigern.

Tabelle 3.6: Durchschnittliche Einbauraten von Thiolgruppen in den anti-PD-1-Antikörper (Klon 4F10)

Konzentration [mg/ml]	Inkubationszeit [min]	Molarer Überschuss 2-Iminothiolan	Durchschnittlicher Einbau pro Mol	Ausbeute [%]
2	60	160	8,2	70
2	60	100	5,3	24
1-1,9*	90	50	1,2	50-74

*) in dieser Zeile sind mehrere Ansätze zusammengefasst

Das Ergebnis zeigte, dass eine Erhöhung des Überschusses zu einer hohen Einbaurrate führte, die weit von dem gewünschten Bereich entfernt war. Deshalb wurde der Überschuss wieder verringert. Die besten Ergebnisse wurden mit einem 50fach molaren Überschuss und einer Inkubationszeit von 90 min erzielt. Hier lag die Einbaurrate bei 1,2 Mol Thiolgruppen pro Mol

anti-PD-1-AK und die Ausbeute bei 50-74 %. Diese Bedingungen wurden für die weiteren Reaktionen angewendet.

3.1.2.2 Einführung der Maleimidgruppen in nGel

Um die beiden mit Thiolgruppen modifizierten Komponenten gemäß dem Reaktionsschema (siehe Abb. 1.8) zu verknüpfen, musste zunächst noch eines der beiden Proteine mit einem Spacer modifiziert werden. Der Spacer ist in diesem Fall der zuvor (siehe Kap. 3.1.2) beschriebene Bis-(maleimido)-methylether (BMME), mit dem Maleimidgruppen in Proteine eingeführt werden können. Maleimide reagieren mit Thiolgruppen in Proteinen unter Addition und Ausbildung von Thioetherbindungen. Ob Gelonin oder der Antikörper mit BMME modifiziert werden, spielt prinzipiell keine Rolle, da aber der Antikörper nur in begrenzter Menge vorlag, wurde die Modifizierung mit Gelonin, das in ausreichender Menge vorhanden war, durchgeführt. Außerdem war bekannt, dass Versuche von Schanz (Schanz, 2009), den thiolmodifizierten Antikörper mit BMME zu modifizieren, scheiterten. Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an die Dissertation von Kreilinger (Kreilinger, 2001). Eine genaue Beschreibung des Versuchsablaufs ist in Kapitel 5.5.5.3 aufgeführt.

Um einen ausreichenden Einbau an Maleimidgruppen zu erreichen und die Bildung von Homodimeren zu vermeiden, musste ein hoher molarer Überschuss (90-120fach) für die Reaktion eingesetzt werden. Das thiolmodifizierte Gelonin wurde mit dem entsprechenden Überschuss an BMME versetzt, für 25-30 min bei RT inkubiert und im Anschluss in einem VIVASPIN-6-Konzentrator (Ausschlussgrenze 10 kDa) auf ca. 1 ml aufkonzentriert. Hierbei wurde ein Teil des nicht umgesetzten BMME bereits entfernt, der restliche Teil wurde mittels Gelfiltrationschromatographie über eine Sephadex-G-25-Säule entfernt. Da bei allen Reaktionen ähnliche Chromatogramme erhalten wurden ist, in Abbildung 3.9 exemplarisch ein Ergebnis dargestellt.

Es ist zu erkennen, dass die Abtrennung von nicht umgesetztem BMME erfolgreich war. Lediglich eine Trennung von nicht modifiziertem Gelonin, thiolmodifiziertem Gelonin und maleimidmodifiziertem Gelonin kann auf Grund der geringen Massenunterschiede auf diesem Wege nicht erfolgen. Die Bestimmung der Einbauraten von Maleimidgruppen erfolgte nach der Methode von Ishikawa (Ishikawa *et al.*, 1983) und die Durchführung nach dem Schema

3. Eigene Ergebnisse und Diskussion

von Rousselle (Rousselle, 1996). Eine ausführliche Beschreibung befindet sich in Kapitel 5.5.5.4. Die Ergebnisse der Einbaubestimmungen sind in Tabelle 3.7 aufgelistet.

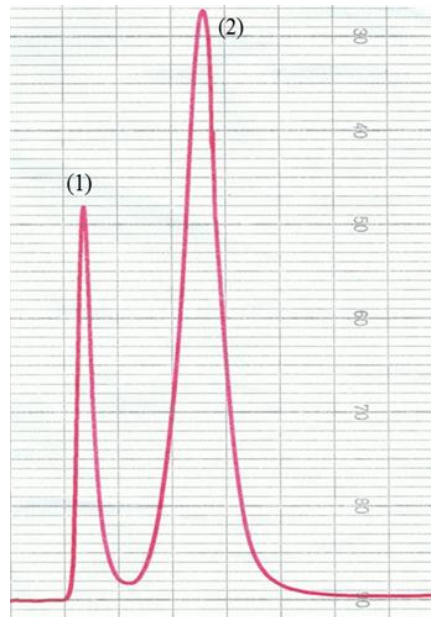


Abbildung 3.9: Chromatogramm der Größenaufschlusschromatographie des mit BMME modifizierten natürlichen Gelonins: (1) Peak von Gelonin, thiolmodifiziertem Gelonin und maleimidmodifiziertem Gelonin (Gelonin-BMME); (2) Peak von nicht umgesetztem BMME.

Tabelle 3.7: Durchschnittliche Einbauraten von Maleimidgruppen in thiolmodifiziertes Gelonin

Durchschnittlicher Thioleinbau pro Mol	Inkubationszeit [min]	Molarer Überschuss BMME	Durchschnittlicher Maleimideinbau pro Mol	Ausbeute [%]
2,8-4,6*	30	100-120	0,9-1,9	68-77
1,3-1,6*	25-30	90-100	0,6-2,8	53-89
1,2-2,8*	30	100	0,5-1,0	56-72

*) in dieser Zeile sind mehrere Ansätze zusammengefasst

Es wurde versucht, eine Einbaurate von bis zu 2 Mol Maleimidgruppen pro Mol Gelonin-SH zu erzielen. Dies wurde bei den meisten Reaktionen erreicht. Jedoch wurde bei den ersten Versuchen noch thiolmodifiziertes Gelonin eingesetzt, bei dem die Einbaurate über 2 Mol Thiolgruppen pro Mol Gelonin lag. Ein Aktivitätsverlust von Gelonin konnte hier nicht ausgeschlossen werden. Die besten Reaktionsbedingungen sind eine 30-minütige Inkubationszeit und ein 100fach molarer Überschuss an BMME, denn hier lagen die durchschnittlichen Einbauraten im Bereich von 0,5-1,0 Mol Maleimid pro Mol Gelonin-SH und die Ausbeute bei

56-72 %. In einigen Fällen war hier die Einbaurate an Maleimiden höher als die zuvor erzielte Einbaurate von Thiolgruppen, die Gründe hierfür sind vermutlich Messungenauigkeiten des verwendeten Standards. Eine Wiederholung der Messungen konnte nicht stattfinden, da ein schnelles Weiterarbeiten für den Erfolg der Kopplung sehr wichtig ist.

3.1.2.3 Kopplung zwischen natürlichem Gelonin und dem anti-PD-1-Antikörper

Zur Kopplung der beiden Komponenten gemäß dem Reaktionsschema in Abbildung 1.8 erfolgte im letzten Reaktionsschritt die Bindung von thiolmodifiziertem Antikörper an maleimidmodifiziertes Gelonin durch Generierung einer Thioetherbrücke. Hierzu wurden die beiden Komponenten je nach Ansatz in unterschiedlichen Volumenverhältnissen (siehe Kap. 5.5.5.5) gemischt und in einem VIVASPIN-6-Konzentrator (Ausschlussgrenze 10 kDa) auf ca. 1 ml aufkonzentriert. Im Anschluss wurde das Reaktionsgemisch unter Schutzgas je nach Ansatz für 2-4 Tage bei 4 °C inkubiert. Die genaue Durchführung ist in Kapitel 5.5.5.5 beschrieben. Es wurde davon ausgegangen, dass sich wahrscheinlich nach einigen Tagen alle reaktiven Gruppen der Edukte, die nicht miteinander reagierten, durch Oxidation und Hydrolyse zersetzten und deshalb keine Konjugatbildung mehr stattfinden konnte. Das Reaktionsgemisch wurde nach Beenden der Inkubation mittels SDS-PAGE (siehe Kap. 5.2.2) auf die Bildung von Konjugat untersucht. Hierbei wurden nicht reduzierende Bedingungen gewählt, um die Disulfidbrücken und somit die Ketten innerhalb des Antikörpers voneinander nicht zu spalten. Das Ergebnis ist exemplarisch für einen Ansatz in Abbildung 3.10 dargestellt.

Auf dem Gel von Klon J43 (Bahn 1-3) ist in Bahn 2 oberhalb der Antikörperbande (190 kDa) noch eine weitere schwache Bande (220 kDa) erkennbar. Diese Bande lässt darauf schließen, dass sich Konjugat gebildet hat. Auch bei Klon 4F10 (Bahn 4-6) ist in Bahn 6 außer der Antikörperbande (170 kDa) noch eine Bande bei ca. 200 kDa zu erkennen. Deshalb kann auch hier davon ausgegangen werden, dass sich das Konjugat gebildet hat. Bei den sichtbaren Banden oberhalb der Konjugatbande könnte es sich um Mehrfachkonjugate oder Homodimere des Antikörpers handeln. Eine genauere Charakterisierung war nicht möglich, weil keine gute Trennung der Banden gegeben war. Im Reaktionsgemisch befand sich auch noch nicht gekoppeltes Gelonin (30 kDa) und dimeres Gelonin, allerdings konnte dies nur über eine SDS-

PAGE mit einem 12%igen Trenngel unter reduzierenden Bedingungen (Daten hier nicht gezeigt) nachgewiesen werden.

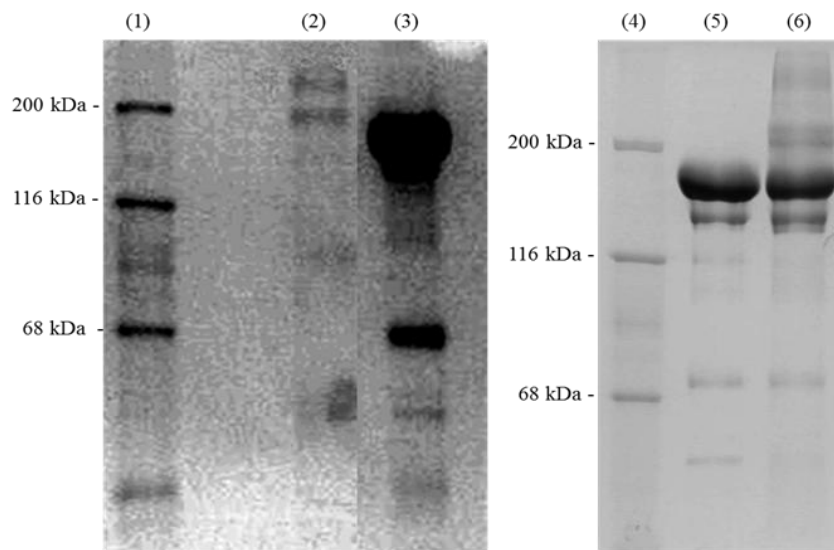


Abbildung 3.10: SDS-PAGE (7%ige Trenngele, nicht reduzierende Bedingungen) zum Nachweis von gebildetem Konjugat: In Bahn 1-3 ist das Ergebnis von Klon J43 dargestellt. Bahn (1): Proteinmarker; Bahn (2): Reaktionsgemisch (10 μ l); Bahn (3): anti-PD-1-Antikörper (Klon J43) (5 μ l). In Bahn 4-6 ist das Ergebnis für Klon 4F10 dargestellt. Bahn (4): Proteinmarker; Bahn (5): Reaktionsgemisch (10 μ l); Bahn (6): anti-PD-1-Antikörper (Klon 4F10) (5 μ g).

3.1.2.4 Aufreinigung des anti-PD-1-Gelonin-Konjugats mittels HPLC

Um die nicht umgesetzten Edukte (Gelonin und anti-PD-1-AK) aus dem Reaktionsgemisch zu entfernen und reines anti-PD-1-Gelonin-Konjugat zu erhalten, wurde eine Auftrennung der Komponenten nach ihrer Größe mittels der Hochdruckflüssigchromatographie (siehe Kap. 5.5.5.6.1) durchgeführt. Das Reaktionsgemisch wurde bei einer Flussrate von 0,5 oder 1 ml/min über den Schleifen-Injektor auf die HPLC-Säule (Agilent ZORBAX-Bio-Series-GF-250) gegeben. Die Detektion erfolgte bei 280 nm und die Fraktionen (1 oder 1,5 ml) wurden gemäß dem Chromatogramm gesammelt und zugeordnet. Die Chromatogramme zeigten für alle Ansätze einen ähnlichen Verlauf, deshalb ist in Abbildung 3.11 exemplarisch das Ergebnis für einen Ansatz dargestellt. Ein Vergleich des Chromatogramms der reinen Substanzen (hier nicht gezeigt) und deren Elutionszeiten ermöglichte die Zuordnung der Peaks in Abbildung 3.11. Es ergab sich, dass Gelonin ($t_E = 17,2$ min) und homodimeres Gelonin ($t_E = 11,7$ min) von den anderen Komponenten abgetrennt wurde. Es war allerdings nicht möglich, den anti-PD-1-AK und das Konjugat voneinander zu trennen. Sie eluierten beide in dem Peak mit Maximum bei $t_E = 9,5$ min, der im Vergleich zum reinen Antikörper

3. Eigene Ergebnisse und Diskussion

($t_E = 9,3$ min, hier nicht gezeigt) etwas verbreitert und zeitverschoben war. Der Grund für die nicht vollständige Trennung ist der geringe Massenunterschied von nur 30 kDa zwischen Antikörper (170 bzw. 190 kDa) und Konjugat (200 bzw. 220 kDa).

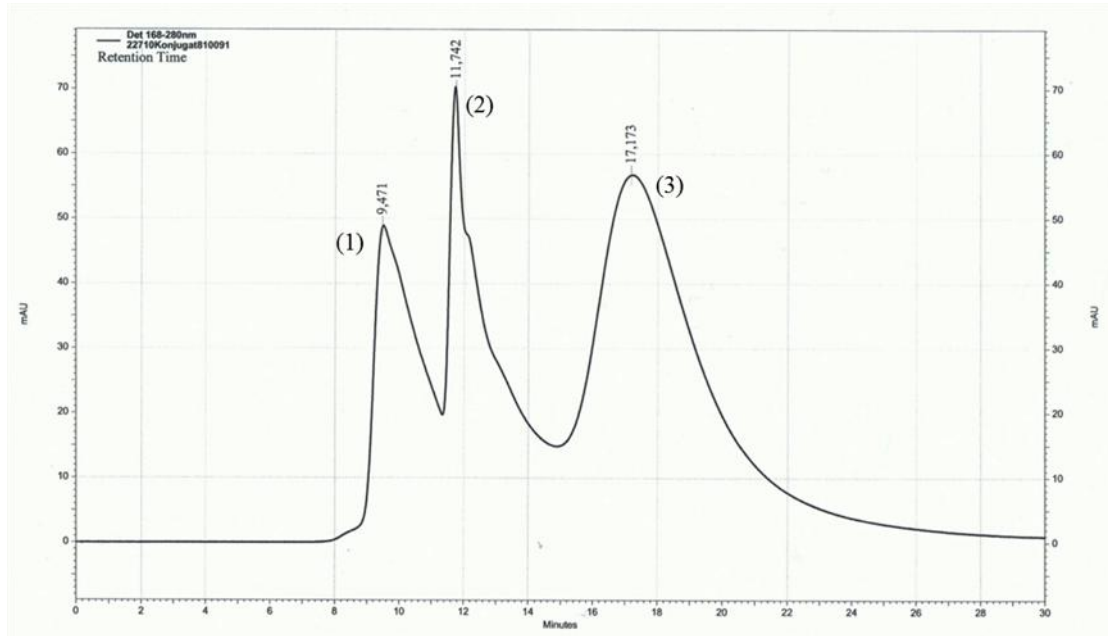


Abbildung 3.11: Chromatogramm der Aufreinigung des Konjugats mit natürlichem Gelonin mittels HPLC: Die Zuordnung der Peaks erfolgt auf Grund der Elutionszeiten (t_E) der nicht gekoppelten Substanzen: (1) Peak des anti-PD-1-Antikörpers und des anti-PD-1-Gelonin-Konjugats ($t_E = 9,5$ min); (2) dimeres Gelonin ($t_E = 11,7$ min); (3) natürliches Gelonin ($t_E = 17,2$ min).

Um das Ergebnis zu bestätigen, wurde eine SDS-PAGE (siehe Kap. 5.2.2) von allen gesammelten Fraktionen durchgeführt. Da die Konzentrationen der Fraktionen durch die Verdünnung mit Puffer während der Chromatographie sehr niedrig waren, musste von den Proben eine TCA-Fällung (siehe Kap. 5.2.4.2) durchgeführt werden, damit schwache Banden auf dem Gel zu erkennen waren. Das Ergebnis (hier nicht gezeigt) bestätigte, dass Gelonin und homodimeres Gelonin abgetrennt werden konnten. Außerdem wurde gezeigt, dass Antikörper und Konjugat nicht getrennt werden konnten. Um eine Trennung der beiden Komponenten zu ermöglichen, musste also nach alternativen Methoden gesucht werden.

3.1.2.5 Diskussion

Die Modifizierung von natürlichem Gelonin und beiden Klonen des anti-PD-1-Antikörpers mit 2-Iminothiolan war nach der Optimierung erfolgreich. Für Gelonin wurden mit einem 60fach molaren Überschuss an 2-Iminothiolan und einer Inkubationszeit von 60 min die

besten Einbauraten von 1,3-1,6 Mol Thiolgruppen pro Mol Gelonin erreicht. Die Ausbeuten lagen hier im Bereich von 40-86 %. Beim anti-PD-1-AK (Klon J43) wurde das beste Ergebnis mit einem 80fach molaren Überschuss an 2-Iminothiolan und einer Inkubationszeit von 60 min erzielt. Die Ausbeute lag bei 87 % und die Einbaurate war 0,8 Mol Thiolgruppen pro Mol Antikörper. Es stellte sich heraus, dass diese Parameter nicht auf die Reaktion mit dem anti-PD-1-AK (Klon 4F10) übertragen werden konnten, denn hier wurde die beste Einbaurate von 1,2 Mol Thiolgruppen pro Mol Antikörper und eine Ausbeute von 50-74 % durch eine 90-minütige Inkubationszeit und einen 50fach molaren Überschuss an 2-Iminothiolan erreicht. Das mit Thiolgruppen modifizierte Gelonin wurde nach Optimieren der Reaktion erfolgreich mit BMME modifiziert. Hier wurde das beste Ergebnis mit einem 100fach molaren Überschuss an BMME bei einer Inkubationszeit von 30 min erzielt, denn hier lagen die durchschnittlichen Einbauraten je nach Ansatz im Bereich von 0,5-1,0 Mol Maleimid pro Mol Gelonin-SH und die Ausbeute bei 56-72 %. Der Kopplung der beiden modifizierten Komponenten war für beide Antikörperklone erfolgreich, denn auf den SDS-Gelen waren die jeweiligen Banden bei 220 kDa (Klon J43) und 200 kDa (Klon 4F10) sichtbar. Das anti-PD-1-Gelonin-Konjugat wurde also gebildet. Da in der Reaktionslösung auch noch die nicht gekoppelten Edukte enthalten waren, wurde versucht diese mittels HPLC zu entfernen. Dies war nicht erfolgreich, denn nur freies Gelonin konnte entfernt werden. Eine Trennung von freiem Antikörper und Konjugat war auf Grund des geringen Massenunterschieds nicht möglich. Es musste also nach Alternativen für die Trennung gesucht werden.

3.1.3 Herstellung des anti-PD-1-Gelonin-Konjugats mit rekombinantem Gelonin

Da sich das Konjugat mit natürlichem Gelonin nicht mittels Größenaufschlusschromatographie von freiem Antikörper trennen ließ wurde als alternative Methode die Kopplungsreaktion mit rekombinantem Gelonin durchgeführt. Denn durch den in rGel enthaltenen His-Tag bot sich hier die Möglichkeit, das Konjugat und den Antikörper mittels Nickelaffinitätschromatographie zu trennen. Ein weiterer Vorteil war, dass rGel auf Grund seiner fehlenden Glykosylierung weniger immunogen ist als nGel und somit für *in vitro*- und *in vivo*-Versuche mit dem Konjugat besser geeignet ist (Hossann, 2004). Die Kopplungsreaktion von rGel mit dem anti-PD-1-AK erfolgte unter Berücksichtigung aller Optimierungen analog zu der mit nGel (siehe Kap. 3.1.2).

3.1.3.1 Modifizierung von rekombinantem Gelonin und dem anti-PD-1-Antikörper mit 2-Iminothiolan

Die beiden Proteinkomponenten (rGel und anti-PD-1-AK) besitzen keine freien Thiolgruppen und müssen deshalb zunächst mit 2-Iminothiolan modifiziert werden. Die Durchführung erfolgte analog zu der von nGel mit den in Kapitel 3.1.2.1.1 und 3.1.2.1.2 beschriebenen Optimierungen. Für die Modifizierung des anti-PD-1-Antikörpers wurde hier nur der Klon 4F10 verwendet. Die nach der Abtrennung des überschüssigen 2-Iminothiolans erhaltenen Chromatogramme sind für alle Ansätze ähnlich und zeigen das gleiche Ergebnis wie in Abbildung 3.7 und 3.8. Mittels der Methode von Grasseti (Grasseti *et al.*, 1967) und dem Schema von Rousselle (Rousselle, 1996) wurden analog zu Kapitel 3.1.2.1.1 und 3.1.2.1.2 die Einbauraten bestimmt. Die Ergebnisse für die Einbauraten und die Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 3.8 aufgelistet.

Tabelle 3.8: Durchschnittliche Einbauraten von Thiolgruppen in rGel und anti-PD-1-AK

	Konzentration [mg/ml]	Inkubationszeit [min]	Molarer Überschuss 2-Iminothiolan	Durchschnittlicher Einbau pro Mol	Ausbeute [%]
rGel	1,2-1,4*	90	30	0,8	118-139
anti-PD-1-Ak	0,5-1*	90	50	0,8-1,5	40

*) in dieser Zeile sind mehrere Ansätze zusammengefasst

Mit einer durchschnittlichen Einbaurate von 0,8 Mol Thiolgruppen pro Mol rGel liegt auch hier der Wert unter 2 Mol Thiolgruppen pro Mol Gelonin, was laut Brust (Brust *et al.*, 1987) bedeutet, dass die biologische Aktivität weitestgehend erhalten bleibt. Allerdings sind hier die Einbauraten unter den gleichen Bedingungen niedriger als bei nGel (siehe Kap. 3.1.2.1.1). Dies spricht dafür, dass rGel anders reagiert als nGel. Außerdem liegen die Werte für die Ausbeute über 100 %, was chemisch nicht möglich ist. Hierbei handelt es sich vermutlich um Messungenauigkeiten, die zu Fehlern in der Rechnung führten. Die Messungen konnten aus zeitlichen Gründen nicht wiederholt werden, da wegen der SH-Oxidation eine schnelle Weiterverarbeitung nötig ist. Die durchschnittlichen Einbauraten von 0,8-1,5 Mol Thiolgruppen pro Mol anti-PD-1-Ak liegen im gleichen Bereich wie in Kapitel 3.1.2.1.2. Mit den dort ermittelten Bedingungen ist die Reaktion also erfolgreich.

3.1.3.2 Einführung der Maleimidgruppen in rGel

Damit die beiden mit Thiolgruppen modifizierten Proteine (rGel und anti-PD-1-AK) nach dem Reaktionsschema (siehe Abb. 1.8) verknüpft werden konnten, wurde auch hier wie bei nGel (siehe Kap. 3.1.2.2) der Spacer BMME zur Modifikation von rGel eingesetzt. Die Einführung von Maleimidgruppen erfolgte analog zu nGel und wurde unter Berücksichtigung der in Kapitel 3.1.2.2 gemachten Optimierungen durchgeführt. Die nach der Abtrennung des überschüssigen BMME erhaltenen Chromatogramme sind alle ähnlich und zeigen das gleiche Ergebnis wie in Abbildung 3.9. Die Einbauraten wurden analog zu Kapitel 3.1.2.2 nach der Methode von Ishikawa (Ishikawa *et al.*, 1983) bestimmt und die Durchführung erfolgte nach dem Schema von Rousselle (Rousselle, 1996). Die Ergebnisse der Einbaubestimmung und die Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 3.9 aufgelistet.

Tabelle 3.9: Durchschnittliche Einbauraten von Maleimidgruppen in thiolmodifiziertes rGel

Durschnittlicher Thioleinbau pro Mol	Inkubationszeit [min]	Molarer Überschuss BMME	Durchschnittlicher Maleimideinbau pro Mol	Ausbeute [%]
0,8*	30	100	0,5-1,9	29-45

*) in dieser Zeile sind mehrere Ansätze zusammengefasst

Die durchschnittlichen Einbauraten von 0,5-1,9 Mol Maleimidgruppen pro Mol rGel liegen im gewünschten Bereich von bis zu 2 Mol Maleimidgruppen pro Mol rGel und stimmen mit den Ergebnissen in Kapitel 3.1.2.2 überein. Lediglich die Ausbeute ist hier mit 29-45 % niedriger. Der Grund hierfür könnte sein, dass die Einbaurate von Thiolgruppen bei dem verwendeten modifizierten rGel hier niedriger war. In einigen Fällen lag auch hier die Einbaurate an Maleimiden höher als die zuvor erzielte Einbaurate von Thiolgruppen, die Gründe hierfür sind auch hier Messungenauigkeiten des verwendeten Standards. Eine Wiederholung der Messungen war auch hier nicht möglich, da ein zügiges Weiterarbeiten für die Reaktion sehr wichtig ist.

3.1.3.3 Kopplung zwischen rekombinantem Gelonin und dem anti-PD-1-Antikörper

Die Kopplung von maleimidmodifiziertem rGel und thiolmodifiziertem anti-PD-1-AK gemäß dem Reaktionsschema in Abbildung 1.8 erfolgte analog zu nGel (siehe Kap. 3.1.2.3). Nach Beenden der Inkubation wurde das Reaktionsgemisch mittels SDS-PAGE (siehe Kap. 5.2.2) unter nicht reduzierenden Bedingungen auf die Bildung von Konjugat untersucht. Das Ergebnis ist exemplarisch für einen Ansatz in Abbildung 3.12 dargestellt.

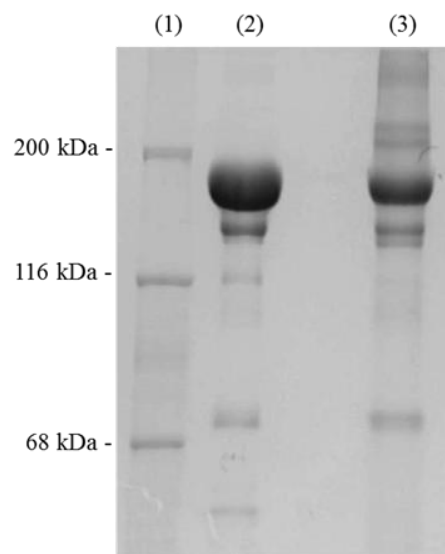


Abbildung 3.12: SDS-PAGE (7%iges Trenngel, nicht reduzierende Bedingungen) zum Konjugatnachweis nach der Kopplungsreaktion mit rGel: Bahn (1): Proteinmarker; Bahn (2): anti-PD-1-AK (Klon 4F10) (5 μ l); Bahn (3): Reaktionsgemisch (10 μ l).

Auf dem Gel befindet sich in Bahn (3) oberhalb der Antikörperbande (170 kDa) noch eine Bande bei ca. 199 kDa. Daraus lässt sich schließen, dass sich das Konjugat gebildet hat. Bei den weiteren Banden oberhalb der Konjugatbande könnte es sich um Mehrfachkonjugate oder Homodimere des Antikörpers handeln. Diese konnten aber auf Grund der schlechten Trennung in diesem Bereich nicht weiter charakterisiert werden. Mittels einer weiteren SDS-PAGE (12%iges Trenngel, reduzierende Bedingungen) konnte gezeigt werden, dass sich im Reaktionsgemisch auch noch nicht gekoppeltes rGel (29 kDa) und dimeres Gelonin (58 kDa) befinden (Daten hier nicht gezeigt).

3.1.3.4 Aufreinigung des anti-PD-1-Gelonin-Konjugats mittels HPLC

Zunächst wurde die Abtrennung der nicht umgesetzten Edukte (rGel und anti-PD-1-AK) aus dem Reaktionsgemisch auch hier mittels HPLC (siehe Kap. 5.5.5.6.1) durchgeführt, um die Ergebnisse, die mit dem Konjugat aus nGel und dem anti-PD-1-AK (Klon 4F10) erhalten wurden, zu bestätigen. Die Durchführung erfolgte analog zu Kapitel 3.1.2.4. Das Ergebnis ist auf Grund des ähnlichen Verlaufs aller Ansätze exemplarisch für einen Ansatz in Abbildung 3.13 dargestellt. Im Vergleich der Chromatogramme der reinen Substanzen (hier nicht gezeigt) und deren Elutionszeiten ergab sich, dass es nicht möglich war, den anti-PD-1-AK und das Konjugat voneinander zu trennen. Denn beide eluieren, in einem Peak bei $t_E = 9,7$ min und dieser ist im Vergleich zum reinen Antikörper ($t_E = 9,3$ min, hier nicht gezeigt) verbreitert und die Zeit etwas verschoben. Auch hier ist der Grund für die unvollständige Trennung der geringe Massenunterschied zwischen Antikörper (170 kDa) und Konjugat (199 kDa). Eine Abtrennung von Gelonin ($t_E = 17,2$ min) und homodimerem Gelonin ($t_E = 11,7$ min) war möglich.

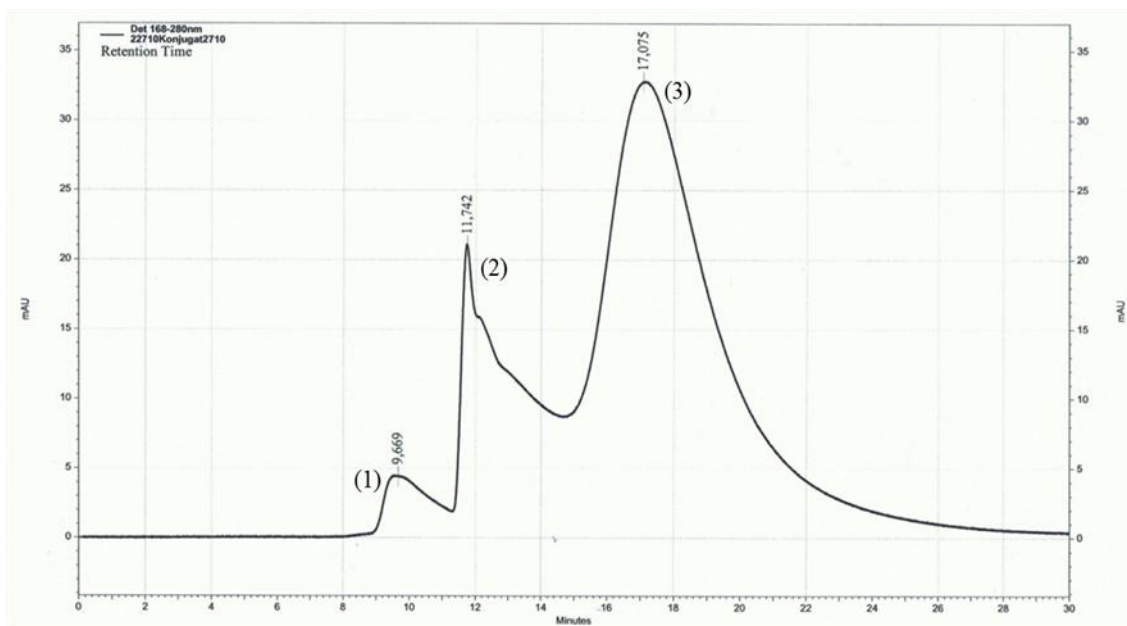


Abbildung 3.13: Chromatogramm der Aufreinigung des Konjugats mit rekombinantem Gelonin mittels HPLC: Die Zuordnung der Peaks erfolgt auf Grund der Elutionszeiten (t_E) der nicht gekoppelten Substanzen: (1) Peak des anti-PD-1-Antikörpers und des anti-PD-1-Gelonin-Konjugats ($t_E = 9,7$ min); (2) dimeres Gelonin ($t_E = 11,7$ min); (3) rekombinantes Gelonin ($t_E = 17,1$ min).

Zur Bestätigung der Ergebnisse wurden die Proben auf Grund ihrer niedrigen Konzentration einer TCA-Fällung (siehe Kap. 5.2.4.2) unterzogen und eine SDS-PAGE der gesammelten Fraktionen durchgeführt. Eine Aufkonzentration (siehe Kap. 5.2.4.1) mit Konzentratoren war hier auf Grund von hohem Proteinverlust nicht möglich. Das Ergebnis (hier nicht gezeigt) bestätigte die Annahme, dass Konjugat und Antikörper nicht getrennt werden konnten und Gelonin sowie dimeres Gelonin aus der Lösung entfernt werden konnten. Außerdem wurde bestätigt, dass eine alternative Methode für die Trennung gesucht werden musste. Des Weiteren sollte die Konzentration des Konjugats erhöht werden, damit nach der Chromatographie noch ausreichend Konjugat für weitere Versuche vorhanden ist.

3.1.3.5 Diskussion

Mit den in Kapitel 3.1.2 ermittelten Bedingungen für die Modifizierung mit 2-Iminothiolan konnten rekombinantes Gelonin und auch der anti-PD-1-Antikörper erfolgreich modifiziert werden. Für rGel wurde eine durchschnittliche Einbaurate von 0,8 Mol Thiolgruppen pro Mol rGel erreicht, was etwas niedriger liegt als bei nGel. Das spricht dafür, dass rGel anders reagiert als nGel. Die Ausbeute konnte hier auf Grund von Messungenauigkeiten nicht richtig ermittelt werden. Beim Antikörper lagen die durchschnittlichen Einbauraten im Bereich von 0,8-1,5 Mol Thiolgruppen pro Mol anti-PD-1-Ak. Auch die Modifikation von thiolmodifiziertem rGel mit BMME war mit einer Einbaurate von 0,5-1,9 Mol Maleimidgruppen pro Mol rGel erfolgreich. Nur die Ausbeuten von 29-45 % waren vermutlich durch die niedrigere Einbaurate von Thiolgruppen bei dem verwendeten modifizierten rGel geringer als bei nGel. Mittels SDS-PAGE konnte nachgewiesen werden, dass die Kopplung der modifizierten Proteine erfolgreich war, denn es war auf dem Gel eine Bande bei ca. 199 kDa zu sehen. Der Versuch, die nicht umgesetzten Edukte mittels HPLC aus der Reaktionslösung zu entfernen, bestätigte noch einmal die Ergebnisse des Konjugats mit nGel. Eine Trennung von Konjugat und Antikörper ist auf Grund des geringen Massenunterschieds nicht möglich. Bevor als alternative Methode für die Trennung die Nickelaffinitätschromatographie eingesetzt werden konnte sollte zunächst die Konjugatkonzentration gesteigert werden.

3.1.4 Steigerung der Konjugatkonzentration und Verbesserung der Aufreinigung

Wie in Kapitel 3.1.3.4 festgestellt wurde war auf Grund der geringen Konzentration der Reaktionslösung und des enthaltenen Konjugats nach der Chromatographie immer eine TCA-Fällung nötig, um auf dem Gel die enthaltenen Komponenten nachzuweisen. Durch die Fällung konnten die enthaltenen Proteine nicht mehr für weitere Versuche verwendet werden. Andererseits führte eine Aufkonzentration (siehe Kap. 5.2.4.1) zum Verlust des Proteins. Deshalb war es notwendig, die Konjugatreaktion in größerem Maßstab durchzuführen, um nach der Verdünnung durch die Chromatographie eine nachweisbare Menge an Proteinen zu erhalten. Die Modifizierung mit Thiolgruppen erfolgte analog zu Kapitel 3.1.3, nur wurden die eingesetzten Proteinmengen erhöht und auf Grund des gesteigerten Volumens musste vor dem Abtrennen des überschüssigen 2-Iminothiolans über die Sephadex-G-25-Säule die Reaktionslösung in einem VIVASPIN-6-Konzentrator (Ausschlussgrenze 10 kDa) auf ca. 1 ml aufkonzentriert werden. Die Chromatogramme hatten einen ähnlichen Verlauf wie in Kapitel 3.1.3 und zeigten, dass das überschüssige Reagenz abgetrennt werden konnte. Die Einbauratenbestimmung nach Grassetti (Grassetti *et al.*, 1967) mit dem Schema von Rousselle (Rousselle, 1996) ergab die in Tabelle 3.10 gelisteten Werte.

Tabelle 3.10: Durchschnittliche Einbauraten von Thiolgruppen in rGel und anti-PD-1-AK (Klon 4F10)

	Einsatz- menge [mg]	Inkubations- zeit [min]	Molarer Überschuss 2-Iminothiolan	Durchschnitt- licher Einbau pro Mol	Ausbeute [%]
rGel	3,8-4*	90	30	0,8-1,2	82
anti-PD-1-Ak	3,8-4*	90	50	0,8-2,5	79-90

*) in einer Zeile sind mehrere Ansätze zusammengefasst

Die Einbaurate von 0,8-1,2 Mol Thiolgruppen pro Mol rGel lag auch hier im gewünschten Bereich, so dass die biologische Aktivität erhalten blieb (Brust *et al.*, 1987). Die Ausbeuten lagen bei 82 % und es wurden auch mit der gesteigerten Einsatzmenge an rGel gute Ergebnisse erzielt. Die Einbauraten von 0,8-2,5 Mol Thiolgruppen pro Mol anti-PD-1-Ak und einer Ausbeute im Bereich von 79-90 % sprechen dafür, dass auch hier mit der gesteigerten Einsatzmenge die Reaktion erfolgreich war. Die Modifizierung mit BMME erfolgte ebenfalls analog zu Kapitel 3.1.3. Die Chromatogramme nach der Abtrennung des überschüssigen Rea-

3. Eigene Ergebnisse und Diskussion

genzes waren ähnlich wie in Kapitel 3.1.3.2 und bestätigten eine erfolgreiche Abtrennung von BMME. Nach der Methode von Ishikawa (Ishikawa *et al.*, 1983) und dem Schema von Rousselle (Rousselle, 1996) wurde die Einbaurate bestimmt. Das Ergebnis ist in Tabelle 3.11 dargestellt.

Tabelle 3.11: Durchschnittliche Einbauraten von Maleimidgruppen in thiolmodifiziertes rGel

Durchschnittlicher Thioleinbau pro Mol	Inkubationszeit [min]	Molarer Überschuss BMME	Durchschnittlicher Maleimideinbau pro Mol	Ausbeute [%]
0,8-1,2*	30	100	0,5	79-90

*) in einer Zeile sind mehrere Ansätze zusammengefasst

Mit durchschnittlichen Einbauraten von 0,5 Mol Maleimidgruppen pro Mol rGel und Ausbeuten im Bereich von 79-90 % war auch die Modifizierung mit BMME bei der gesteigerten Einsatzmenge erfolgreich. Der Wert lag auch hier im gewünschten Bereich, wo die Aktivität von Gelonin erhalten bleibt. Zur Kopplung der beiden modifizierten Komponenten wurde maleimidmodifiziertes rGel mit thiolmodifizierten anti-PD-1-AK im Verhältnis 1:1 vereinigt auf ca. 1 ml aufkonzentriert und je nach Ansatz für 2-4 Tage unter Schutzgas bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mittels SDS-PAGE (siehe Kap. 5.2.2) unter nicht reduzierenden Bedingungen auf die Bildung von Konjugat untersucht. Das Ergebnis ist exemplarisch für einen Ansatz in Abbildung 3.14 gezeigt.

Wie auf dem Gel in Bahn 3 zu deutlich zu erkennen ist, befindet sich oberhalb der Antikörperbande (170 kDa) noch eine weitere Bande bei ca. 199 kDa. Dies lässt vermuten, dass die Reaktion erfolgreich war und das Konjugat gebildet wurde. Auf Grund der Konzentrationssteigerung sind die Banden deutlicher zu erkennen als in Abbildung 3.12. Auch die Banden oberhalb der Konjugatbande, die auf Mehrfachkonjugate oder Homodimere des Antikörpers schließen lassen, sind wieder zu erkennen. Auch das in der Reaktionslösung enthaltene nicht umgesetzte rGel (29 kDa) und dimeres rGel (58 kDa) konnten hier mittels SDS-PAGE (12%iges Trenngel, reduzierende Bedingungen) erneut nachgewiesen werden (Daten hier nicht gezeigt).

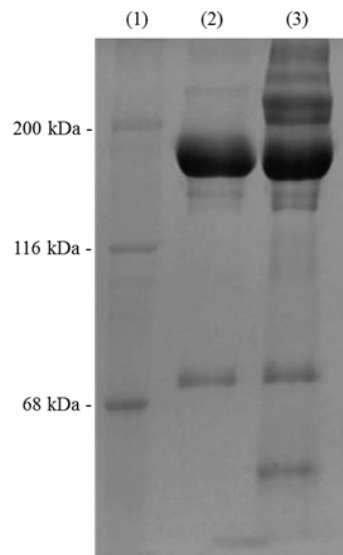


Abbildung 3.14: SDS-PAGE (7%iges Trenngel, nicht reduzierende Bedingungen) zum Nachweis von Konjugat nach der Kopplungsreaktion mit gesteigerten Konzentrationen: Bahn (1): Proteinmarker; Bahn (2): anti-PD-1-AK (Klon 4F10) (5 µl); Bahn (3): Reaktionsgemisch (10 µl).

3.1.4.1 Aufreinigung des Konjugats mittels ÄKTA

Als alternative Methode zur HPLC, mit der die Trennung von Konjugat und Antikörper nicht möglich war, wurde nun die Trennung mittels ÄKTA (siehe Kap. 5.2.6.5) versucht. Hierbei handelt es sich ebenfalls um eine Methode der Gelchromatographie, bei der das Reaktionsgemisch über eine Säule getrennt wird. Der Vorteil im Vergleich zur Trennung über die HPLC-Säule ist hier, dass auch große Proteinmengen aufgereinigt werden können und die gesammelten Fraktionen trotz Verdünnung nachweisbare Konzentrationen an Protein enthalten. Die genaue Durchführung ist in Kapitel 5.5.5.6.2 beschrieben. Über den Injektor werden 500 µl der Reaktionslösung auf die Säule (Superdex-200-10/300-GL oder Superdex-75-10/300-GL) gegeben. Bei einer Flussrate von 0,8 ml/min wurden die Fraktionen gesammelt und mit Hilfe des Chromatogramms zugeordnet. Das Ergebnis ist exemplarisch für einen Ansatz in Abbildung 3.15 gezeigt.

Das Chromatogramm zeigt nur zwei Peaks, was bedeutet, dass eine Trennung von Konjugat und Antikörper auf Grund des geringen Massenunterschieds der beiden Komponenten auch mit dieser Methode nicht möglich ist. Lediglich Gelonin konnte wieder aus der Reaktionslösung entfernt werden. Um dieses Ergebnis zu bestätigen, wurde eine SDS-PAGE (siehe Kap. 5.2.2) der gesammelten Fraktionen durchgeführt. Auf Grund der gesteigerten Konzentrationen und des geringeren Proteinverlusts musste hier aber keine TCA-Fällung der

3. Eigene Ergebnisse und Diskussion

Fraktionen mehr durchgeführt werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.16 und Abbildung 3.17 dargestellt.

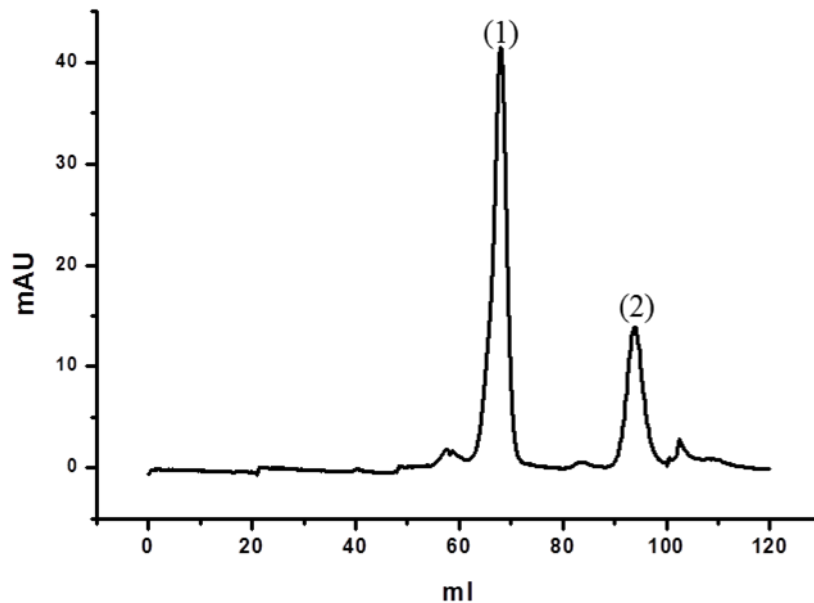


Abbildung 3.15: Chromatogramm der Aufreinigung des Konjugats mit rekombinantem Gelonin mittels ÄKTA: (1) Peak des anti-PD-1-Antikörpers und des anti-PD-1-Gelonin-Konjugats; (2) Peak von rGel.

Das Gel in Abbildung 3.16 bestätigt, dass in den gesammelten Fraktionen von Peak 1 sowohl die Konjugatbande (199 kDa) als auch Antikörperbande (170 kDa) sichtbar sind. Eine Trennung der beiden Komponenten ist also nicht erfolgt. Außerdem wird mit dem Gel in Abbildung 3.17 gezeigt, dass sich rGel (29 kDa) in den gesammelten Fraktionen von Peak 2 befindet. Die Abtrennung von Gelonin aus der Reaktionslösung war also erfolgreich. Dimeres rGel konnte hier im Unterschied zu der Auftrennung mit der HPLC (siehe Kap. 3.1.3.4) nicht nachgewiesen werden. Die gesammelten Fraktionen von Peak 1, die den Hauptteil des Konjugats enthielten (Bahn (5)-(9)), wurden vereinigt, aufkonzentriert und für die Nickelaffinitätschromatographie eingesetzt.

3. Eigene Ergebnisse und Diskussion

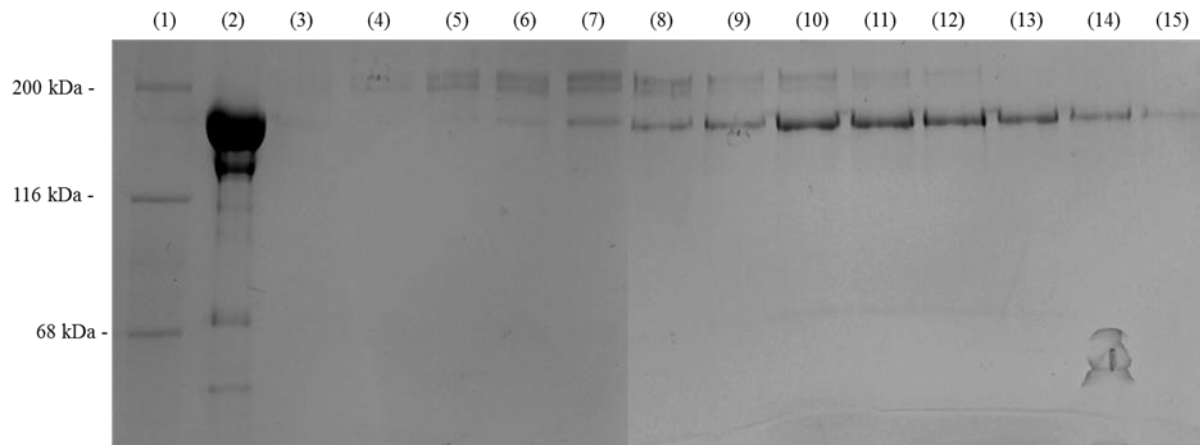


Abbildung 3.16: SDS-PAGE (7%iges Trenngel, nicht reduzierende Bedingungen) der gesammelten ÄKTA-Fractionen von Peak 1: Bahn (1): Proteinmarker; Bahn (2): anti-PD-1-Antikörper (Klon 4F10) (5 μ l), Bahn (3)-(15): gesammelte Fraktionen (15 μ l).

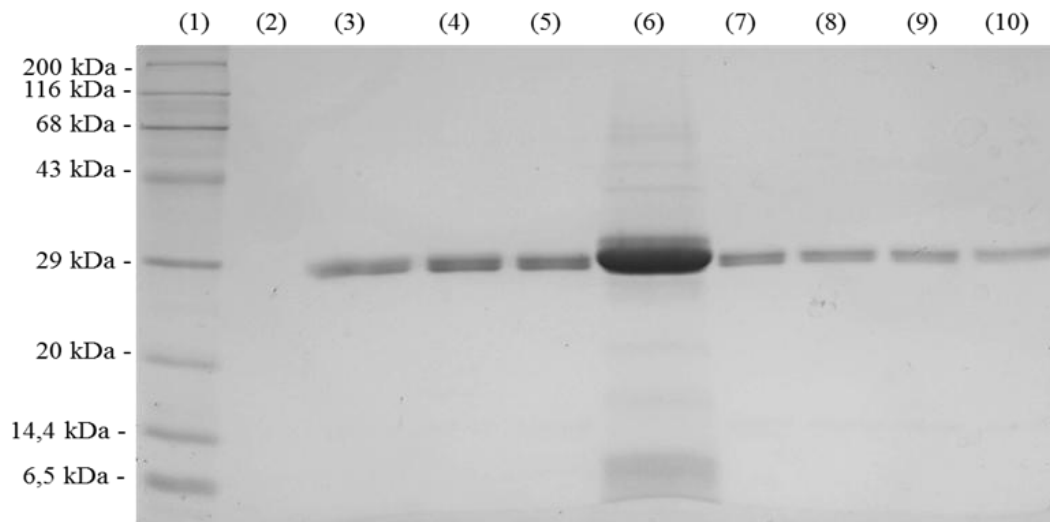


Abbildung 3.17: SDS-PAGE (12%iges Trenngel, reduzierende Bedingungen) der gesammelten ÄKTA-Fractionen von Peak 2: Bahn (1): Proteinmarker; Bahn (2)-(5): gesammelte Fraktionen (15 μ l); Bahn (6): rGel (5 μ l); Bahn (7)-(10): gesammelte Fraktionen (15 μ l).

3.1.4.2 Aufreinigung des Konjugats mittels Nickelaffinitätschromatographie

Ein weiterer Versuch, das Konjugat und den Antikörper zu trennen, erfolgte mittels Nickelaffinitätschromatographie. Hierbei wurde davon ausgegangen, dass das Konjugat auf Grund des in rGel enthaltenen His-Tags an die Säule binden kann und der Antikörper nicht. Durch Elution mit Imidazol kann das Konjugat anschließend wieder von der Säule eluiert werden. Eine ausführliche Beschreibung der Durchführung befindet sich in Kapitel 5.5.5.6.3.

3. Eigene Ergebnisse und Diskussion

Das Reaktionsgemisch wurde dialysiert (siehe Kap. 5.2.3) und anschließend bei einer Flussrate von ca. 1 ml/min auf die äquilibrierte Säule gegeben. Mittels des Chromatogramms (hier nicht gezeigt) wurden die gesammelten Fraktionen zugeordnet. Die für weitere Versuche benötigten Fraktionen wurden dialysiert, um das Imidazol aus der Probe zu entfernen, und wegen der geringen Konzentrationen aufkonzentriert. Mittels SDS-PAGE (siehe Kap. 5.2.2) wurden die Fraktionen untersucht. In Abbildung 3.18 ist das Ergebnis dargestellt.

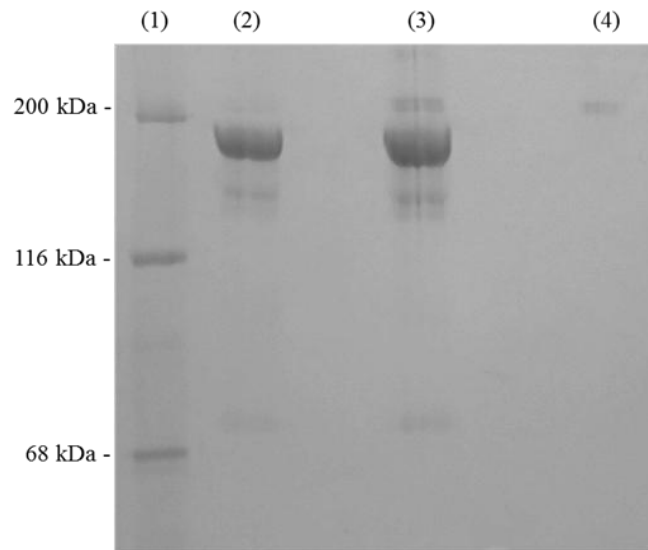


Abbildung 3.18: SDS-PAGE (7%iges Trenngel, nicht reduzierende Bedingungen) der gesammelten Fraktionen während der Nickelaffinitätschromatographie: Bahn (1): Proteinmarker; Bahn (2): Bindungsfraction (10 μ l); Bahn (3): Waschfraction (10 μ l); Bahn (4): Elutionsfraction (10 μ l).

In der Bindungsfraction (Bahn 2) sind sowohl Antikörper (170 kDa) als auch geringe Spuren des Konjugats (199 kDa) enthalten. Das bedeutet, dass der größte Teil des Konjugats wie gewünscht an die Säule gebunden hat. In der Waschfraction (Bahn 3) befinden sich auch beide Komponenten, das zeigt, dass auch leider ein Teil des Antikörpers unspezifisch an die Säule gebunden wurde und der größte Anteil des Konjugats schon bei einer geringeren Imidazolkonzentration (200 mM) als erwartet eluierte. Eine Trennung der beiden Komponenten ist hier nicht gegeben. In der Elutionsfraction (500 mM Imidazol, Bahn 4) ist eine schwache Konjugatbande zu erkennen, somit kann mit dieser Methode doch eine Trennung der beiden Komponenten erreicht werden. Allerdings muss die Methode noch optimiert werden, um den Anteil des Konjugats in der Elutionsfraction zu erhöhen. Hierzu könnte in mehreren kleinen Schritten die Konzentration an Imidazol zur Elution (Imidazolgradient) gesteigert werden. Dies stellt einen guten Ansatzpunkt für zukünftige Arbeiten dar.

3.1.4.3 Immunologischer Nachweis des anti-PD-1-Gelonin-Konjugats

Da mittels SDS-PAGE (siehe Abb. 3.14) das gebildete anti-PD-1-Gelonin-Konjugat nur auf Grund seiner Größe identifiziert wurde, sollte seine Identität noch einmal bestätigt werden. Der spezifische Nachweis des Konjugats erfolgte mit Hilfe der immunologischen Methoden ELISA (siehe Kap. 5.4.1) und Western-Blot (siehe Kap. 5.4.2). Für den ELISA wurden als Positivkontrolle rekombinantes Gelonin (20 µg/Well) und als Negativkontrolle BSA (20 µg/Well) eingesetzt. Außerdem wurde der anti-PD-1-AK zur Kontrolle mit allen verwendeten Antikörpern auf mögliche Kreuzreaktionen getestet. Als Probe (10 µg/Well) dienten 2 Fraktionen mit einem Gemisch aus Konjugat und Antikörper, das nach der Abtrennung von nicht umgesetztem Gelonin mittels ÄKTA (siehe Kap. 3.1.4.1) erhalten wurde. Als Primärantikörper dienten der anti-His-Ak (Verdünnung 1:1000), sowie der im Rahmen dieser Dissertation hergestellte anti-Gelonin-AK (Klon C5, siehe Kap. 3.2, Verdünnung 1:1000). Als Sekundärantikörper diente der anti-Maus-IgG-AP (F_c-spezifisch, Verdünnung 1:1000). Das Ergebnis des ELISA ist in Abbildung 3.19 dargestellt.

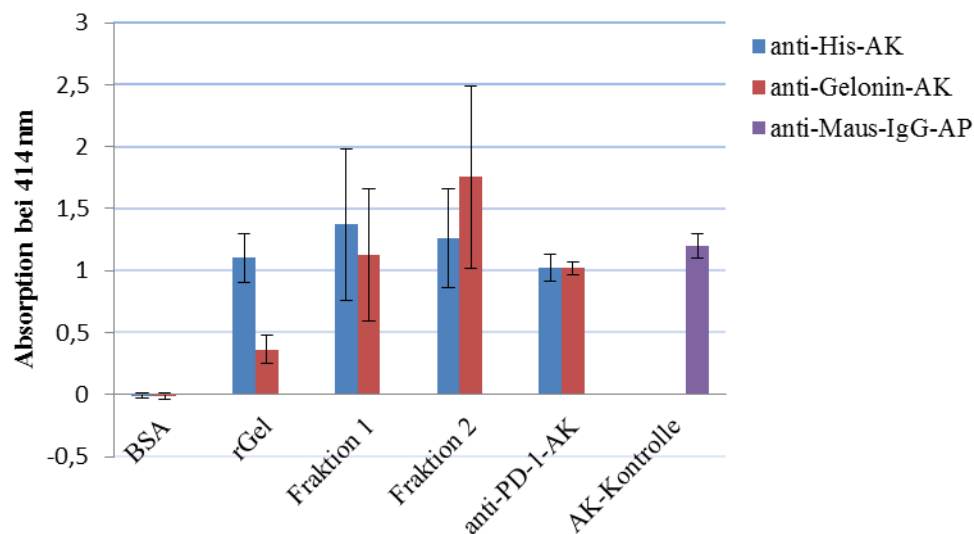


Abbildung 3.19: Ergebnis des spezifischen Nachweises von gebildetem Konjugat mittels ELISA: Die verschiedenen Antigene (BSA, rGel, anti-PD-1-AK, ÄKTA Fraktionen 1 und 2) wurden mit den 2 Primärantikörpern anti-His und anti-Gelonin versetzt und mit dem Sekundärantikörper anti-Maus-IgG-AP detektiert. Im Diagramm ist die nach 6 min gemessene Absorption dargestellt.

Das Ergebnis zeigt, dass der für die Herstellung des Konjugats verwendete anti-PD-1-AK (Klon 4F10) eine positive Reaktion mit dem Sekundärantikörper anti-Maus-IgG-AP (F_c-spezifisch) zeigt. Das bedeutet, dass sich auf Grund dieser Kreuzreaktion die positive Reaktion von Fraktion 1 und 2 nicht eindeutig auf das enthaltene Konjugat zurückführen lässt. Um einen eindeutigen Nachweis des Konjugats zu ermöglichen, müssten die Fraktionen

3. Eigene Ergebnisse und Diskussion

entweder reines Konjugat enthalten oder es muss ein anderer Sekundärantikörper gefunden werden, der keine Kreuzreaktionen zeigt. Für zukünftige Arbeiten sollten diese Ansätze berücksichtigt werden.

Mittels einer SDS-PAGE (7%iges Gel, nicht reduzierende Bedingungen) und anschließendem Western-Blot wurde ebenfalls versucht, in den beiden ÄKTA-Fractionen das Konjugat spezifisch nachzuweisen. Hierzu wurden als Primärantikörper zum einen der anti-His-Ak (Verdünnung 1:2000) und zum anderen der anti-Gelonin-AK (Klon C5, Verdünnung 1:1000) eingesetzt. Zur Detektion diente der anti-Maus-IgG-AP-AK (F_c-spezifisch, Verdünnung 1:2000). Das Ergebnis des Western-Blots ist in Abbildung 3.20 gezeigt.

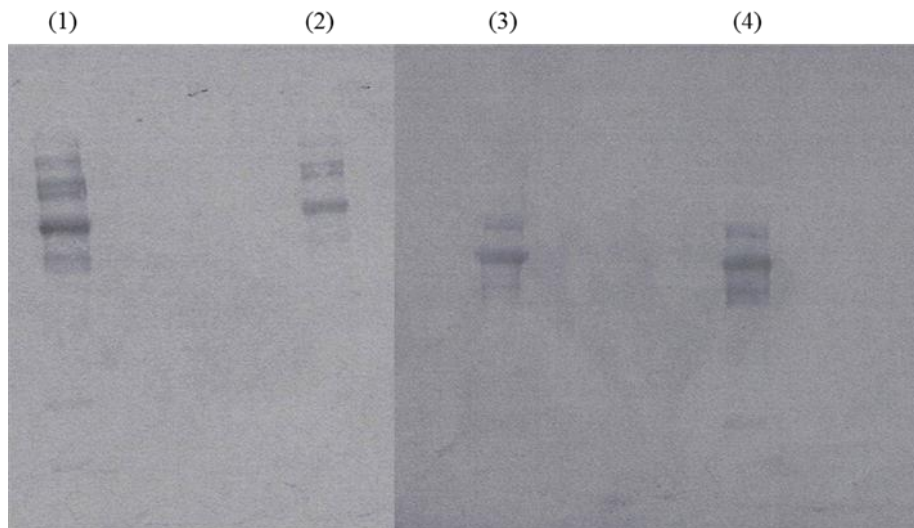


Abbildung 3.20: Ergebnis des spezifischen Nachweises von gebildetem Konjugat mittels Western-Blot: In Bahn 1 und 2 sind die Ergebnisse mit dem Primärantikörper anti-His dargestellt. Bahn (1): Fraktion 1 (150 µg); Bahn (2): Fraktion 2 (150 µg). In Bahn 3 und 4 sind die Ergebnisse mit dem Primärantikörper anti-Gelonin dargestellt. Bahn (3): Fraktion 1 (150 µg); Bahn (4): Fraktion 2 (150 µg).

In Bahn 1 und 2 sind sowohl die Antikörperbande (170 kDa) als auch die Konjugatbande (199 kDa) zu erkennen. Das zeigt, dass in den zwei Fraktionen die beiden Komponenten enthalten sind. Auch in Bahn 3 und 4 sind Antikörper und Konjugat sichtbar. Auf Grund der im ELISA (siehe Abbildung 3.22) ermittelten Kreuzreaktionen des anti-PD-1-Antikörpers mit dem Sekundärantikörper anti-Maus-IgG-AP (F_c-spezifisch) kann die Reaktion aber nicht spezifisch auf den Primärantikörper und somit die Detektion von rGel im Konjugat zurückgeführt werden. Um einen spezifischen Nachweis des Konjugats zu erreichen, sollte nach einem anderen Sekundärantikörper gesucht werden, der keine Kreuzreaktion mit anti-PD-1-AK zeigt. Außerdem wäre es für den eindeutigen Nachweis notwendig, den Antikörper vom

Konjugat zu trennen. Mittels eines 12%igen SDS-Gels unter reduzierenden Bedingungen und anschließendem Western-Blot (hier nicht gezeigt) konnte mit beiden Primärantikörpern bestätigt werden, dass in den beiden ÄKTA-Fractionen kein nicht umgesetztes rGel mehr enthalten ist, da hier keine Bande bei 29 kDa zu sehen war. Die Abtrennung von rGel aus der Reaktionslösung mittels ÄKTA war erfolgreich.

3.1.4.4 Diskussion

Um die Konzentration des Konjugats für die Aufreinigung mit der ÄKTA zu steigern, wurde die Kopplungsreaktion in großem Maßstab durchgeführt. Dabei wurde bei einem Einsatz von 3,8-4 mg rGel eine durchschnittliche Einbaurate von 0,8 Mol-1,2 Mol Thiolgruppen pro Mol rGel erreicht. Beim anti-PD-1-AK wurde beim Einsatz von 3,75-4 mg eine Einbaurate von 0,8-1,2 Mol Thiolgruppen pro Mol rGel erreicht. Die Modifizierung mit Thiolgruppen war erfolgreich. Mit einer Einbaurate von 0,5 Mol Maleimidgruppen pro Mol rGel war die Modifizierung ebenfalls erfolgreich. Nach der Kopplung konnte das Konjugat deutlich auf dem SDS-Gel durch eine Bande bei ca. 199 kDa identifiziert werden. Es wurde versucht, mittels ÄKTA nicht umgesetztes rGel und anti-PD-1-AK aus der Reaktionsmischung zu entfernen. Das rGel konnte erfolgreich abgetrennt werden. Um das Konjugat und den Antikörper zu trennen, wurde eine Nickelaffinitätschromatographie durchgeführt. Mit dieser Methode wurde der größte Teil von Konjugat und Antikörper nicht getrennt, da das Konjugat zu früh von der Säule eluierte. Nur ein kleiner Teil des Konjugats befand sich in der Elutionsfraktion ohne Antikörper. Eine Optimierung dieser Methode könnte in der Zukunft zu einer erfolgreichen Trennung führen. Eine weitere Möglichkeit für die Aufreinigung des Konjugats wäre die Herstellung einer Affinitätssäule mit anti-Gelonin-Antikörpern. Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht erfolgen, da eine zu geringe Menge Antikörper mit zu niedriger Affinität vorhanden war. Für eine spezifische Charakterisierung des Konjugats mittels ELISA und Western-Blot konnte auf Grund der unvollständigen Trennung nur das Antikörper-Konjugat-Gemisch eingesetzt werden. Dies führte im ELISA zu Problemen, da der anti-PD-1-AK eine Kreuzreaktion mit dem Sekundärantikörper zeigte. Deshalb konnte die positive Reaktion nicht eindeutig auf das im Gemisch enthaltene Konjugat zurückgeführt werden. Bevor weitere Versuche erfolgen, sollte nach alternativen Sekundärantikörpern gesucht werden und eine vollständige Trennung von Antikörper und Konjugat erreicht werden. Das Problem der Kreuzreaktivität ermöglichte auch keinen eindeutigen Nachweis im

Western-Blot. Hier wurde zwar die Konjugatbande detektiert, aber die Reaktion konnte nicht spezifisch auf die Reaktion mit dem Primärantikörper zurückgeführt werden. Auch hier sollte nach alternativen Antikörpern für die Detektion gesucht werden.

3.1.5 Untersuchungen zur Wirkung des anti-PD-1-Gelonin-Konjugats

Nach der erfolgreichen Herstellung des anti-PD-1-Gelonin-Konjugats wurden abschließend noch Untersuchungen zur Wirksamkeit des Konjugats durchgeführt. Zunächst wurde untersucht, ob durch die Kopplungsreaktion die Bindungsaffinität des Antikörpers beeinträchtigt wird. Außerdem wurde die Wirkung des Konjugats *in-vitro* mit PD-1-transfizierten HEK293T Zellen mittels Durchflusszytometrie getestet. Des Weiteren wurde mit Hilfe des *in-vitro*-Translationsassays die Toxizität des Konjugats überprüft. Die abschließenden Versuche zur Wirkung des Konjugats in einem *in-vivo*-Mausmodell für Hauttransplantationen konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr erfolgen.

3.1.5.1 Überprüfung der Bindungsaffinität des anti-PD-1-Antikörpers nach der Kopplungsreaktion

Während der Modifizierung des anti-PD-1-AK und der anschließenden Kopplung an rGel könnte es zur Veränderung der Bindungsaffinität des Antikörpers kommen. Es wurde also mittels Durchflusszytometrie überprüft, ob der Antikörper nach der Reaktion noch spezifisch an PD-1 binden kann. Hierzu wurden mit PD-1 transfizierte HEK293T Zellen mit dem Konjugat inkubiert und anschließend versucht mit spezifischen Antikörpern die Bindung an PD-1 an der Oberfläche der Zellen nachzuweisen. Da zum Zeitpunkt der Versuche noch keine Trennung von Konjugat und Antikörper möglich war, wurde für die Versuche das Reaktionsgemisch mit beiden Komponenten eingesetzt. Lediglich nicht umgesetztes Gelonin war entfernt worden und nicht mehr in der Lösung enthalten. Die Durchführung ist in Kapitel 5.4.3.1 beschrieben.

3.1.5.1.1 Transfektion von HEK293T mit PD-1

Bevor das eigentliche Experiment durchgeführt werden konnte, wurde zunächst eine Transfektion (siehe Kap. 5.3.6) von PD-1 in HEK293T Zellen durchgeführt. Hierzu wurde das Plasmid (pIB30), in das die Sequenz von PD-1 codiert war, mittels einer Plasmidisolierung im Großmaßstab (siehe Kap. 5.5.2.4) isoliert und mittels Nano Drop (siehe Kap. 5.2.1.1) quantifiziert. Es wurde Plasmid-DNA mit einer Konzentration von 2,6 mg/ml isoliert. Anschließend erfolgte die Transfektion mit dem Plasmid pIB30 und einem weiteren Plasmid pI106, das für GFP (*green fluorescent protein*) codiert, indem die HEK293T Zellen für 15 min bei 37 °C mit dem Transfektionsgemisch inkubiert wurden. Nach Entfernen des Gemisches wurden die Zellen in Transfektionsmedium über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag konnte wegen der Co-Transfektion mit GFP zunächst unter dem Mikroskop beobachtet werden, ob die Transfektion mit GFP erfolgreich war. Mittels Durchflusszytometrie (siehe Kap. 5.4.3) wurde dies noch einmal überprüft. Die Daten wurden hierbei so bearbeitet (siehe Kap. 3.1.1.3.1), dass nur die lebenden Zellen betrachtet werden. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.21 dargestellt.

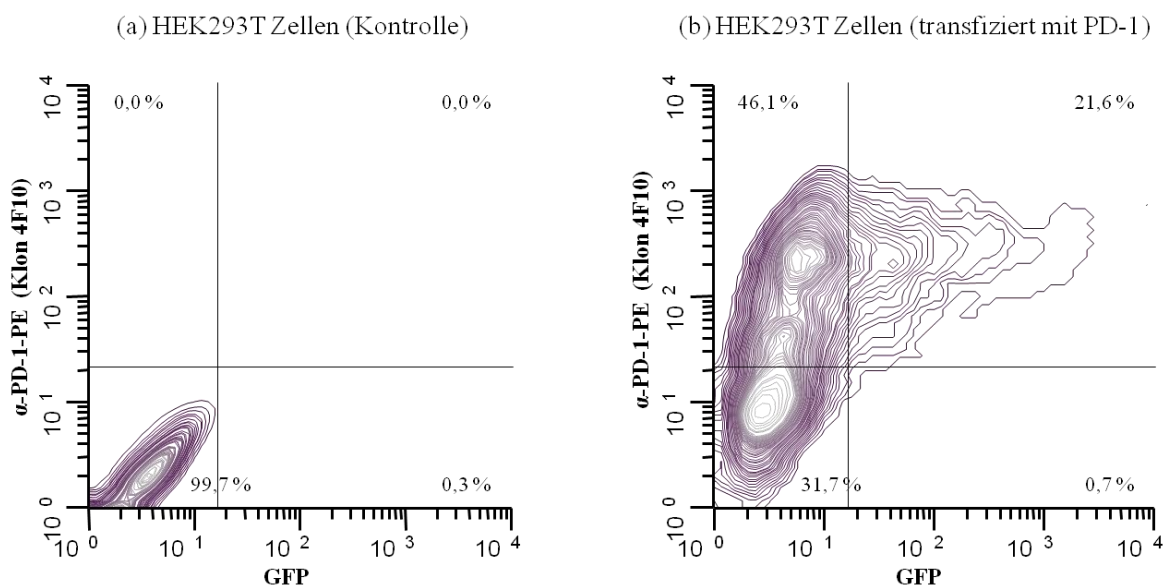


Abbildung 3.21: Überprüfung der Transfektion mittels Durchflusszytometrie: (a) Ergebnis der nicht transfizierten Zellen; (b) Ergebnis der transfizierten Zellen. Als Primärantikörper diente anti-PD-1 (Klon 4F10, 2 μ g/ml) und als Sekundärantikörper wurde Maus-anti-Ratte-IgG_{2a}-Biotin (1 μ g/ml) eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit SA-PE (Verdünnung 1/800). Die toten Zellen wurden durch Zugabe von Propidiumiodid detektiert.

Ein Vergleich der nicht transfizierten Zellen (Graph (a)) mit den transfizierten Zellen (Graph (b)) zeigt, dass die Transfektion erfolgreich war. Denn der größte Anteil (~ 46 %) der leben-

3. Eigene Ergebnisse und Diskussion

den Zellen in (b) zeigt eine positive Reaktion mit dem anti-PD-1-Antikörper, während in (a) die Zellen zu ~ 100 % negativ sind. Daraus folgt, dass die Zellen an ihrer Oberfläche PD-1 exprimieren und der Antikörper seinen Liganden binden kann. Die Zellen können also für die Versuche zur Überprüfung der Bindungsaffinität des Antikörpers eingesetzt werden.

3.1.5.1.2 Kontrolle der Bindungsaffinität des anti-PD-1-Antikörpers

Da die Transfektion der HEK293T Zellen mit PD-1 erfolgreich war, konnte nun die Bindungsaffinität des anti-PD-1-Antikörpers im Konjugat getestet werden. Hierfür wurden die Zellen kultiviert, geerntet und 200000-500000 Zellen pro Ansatz mit unterschiedlichen Mengen des Konjugatgemischs (1, 2, 5 oder 10 μg) inkubiert. Zur Detektion des Konjugats wurden zwei unterschiedliche Primärantikörper, der im Rahmen dieser Arbeit hergestellte Maus-anti-Gelonin-IgG₁-Antikörper (Klon E3) zur Detektion von Gelonin im Konjugat und ein Maus-anti-His-IgG₁ zur Detektion des His-Tags im Konjugat, eingesetzt. Als Sekundärantikörper diente entweder ein Maus-anti-Ratte-IgG_{2a}-Biotin oder ein Ratte-anti-Maus-IgG₁-Biotin und die Entwicklung der Reaktion erfolgte mit Streptavidin-Peroxidase (SA-PE, Verdünnung 1:800). Nach der Zugabe von Propidiumiodid (PI) zur Identifizierung der toten Zellen wurde die Bindungsaffinität mittels des Durchflusszytometers analysiert. Die Daten werden hierbei so bearbeitet (siehe Kap. 3.1.1.3.1), dass nur die lebenden Zellen betrachtet werden. Die Ergebnisse sind in den folgenden Abbildungen dargestellt.

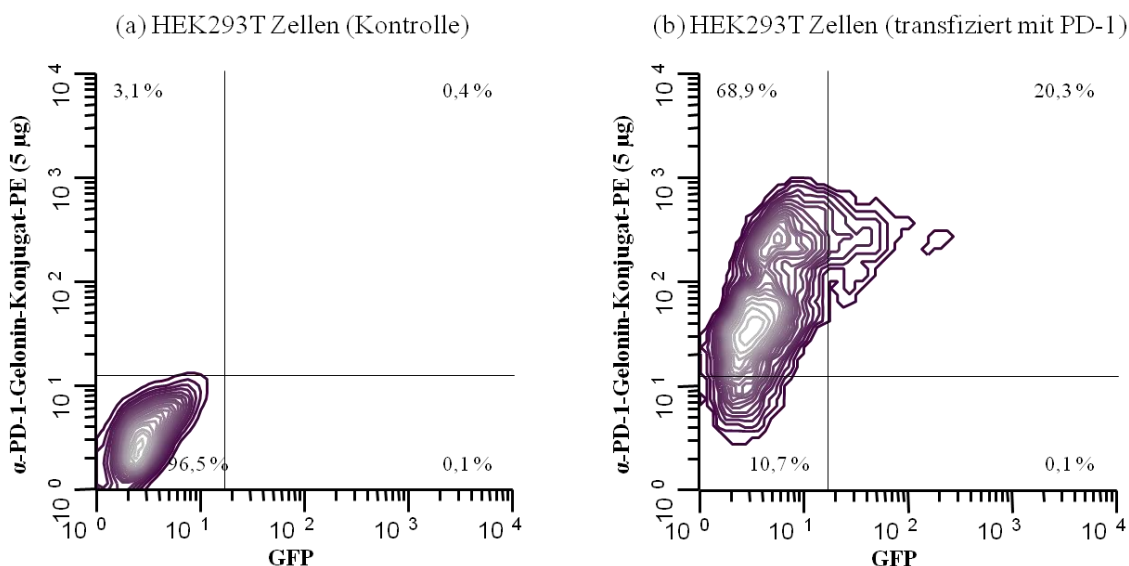


Abbildung 3.22: Überprüfung der Bindungsaffinität des anti-PD-1-Gelonin-Konjugats über den anti-PD-1-Antikörper mittels Durchflusszytometrie: (a) Ergebnis der nicht transfizierten Zellen (500000 Zellen/Ansatz); (b) Ergebnis der transfizierten Zellen (500000 Zellen/Ansatz). Als Primärantikörper diente das Konjugatgemisch (5 μg /Ansatz) und als Sekundärantikörper wurde Maus-anti-Ratte-IgG_{2a}-Biotin (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit SA-PE (Verdünnung 1/800).

3. Eigene Ergebnisse und Diskussion

In Graph (a) von Abbildung 3.22 wurden ~ 97 % der lebenden Zellen negativ auf die Reaktion mit dem Konjugat getestet. Da die Zellen kein PD-1 an ihrer Oberfläche besitzen, kann keine Bindung an die Zellen stattfinden. Bei den mit PD-1 transfizierten Zellen (Graph (b)) zeigen ~ 69 % der lebenden Zellen eine positive Reaktion, somit wurde bestätigt, dass die im Konjugatgemisch enthaltenen Komponenten an die Zellen binden. Da sich aber sowohl das Konjugat als auch der anti-PD-1-AK im Konjugatgemisch befinden, konnte die Reaktion nicht eindeutig dem Konjugat zugeordnet werden. Dadurch wurde nicht bestätigt, ob die Bindungsaffinität des Antikörpers im Konjugat noch erhalten ist. Dieses Ergebnis wurde beim Einsatz von 1 und 10 μg Konjugatgemisch pro Ansatz bestätigt, da hier ähnliche Graphen (hier nicht gezeigt) erhalten wurden. Um die Bindungsaffinität des Konjugats doch noch eindeutig zu bestimmen, wurde der Maus-anti-Gelonin-IgG₁-Antikörper (Klon E3) zur Detektion von Gelonin im Konjugat als Primärantikörper eingesetzt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.23 gezeigt.

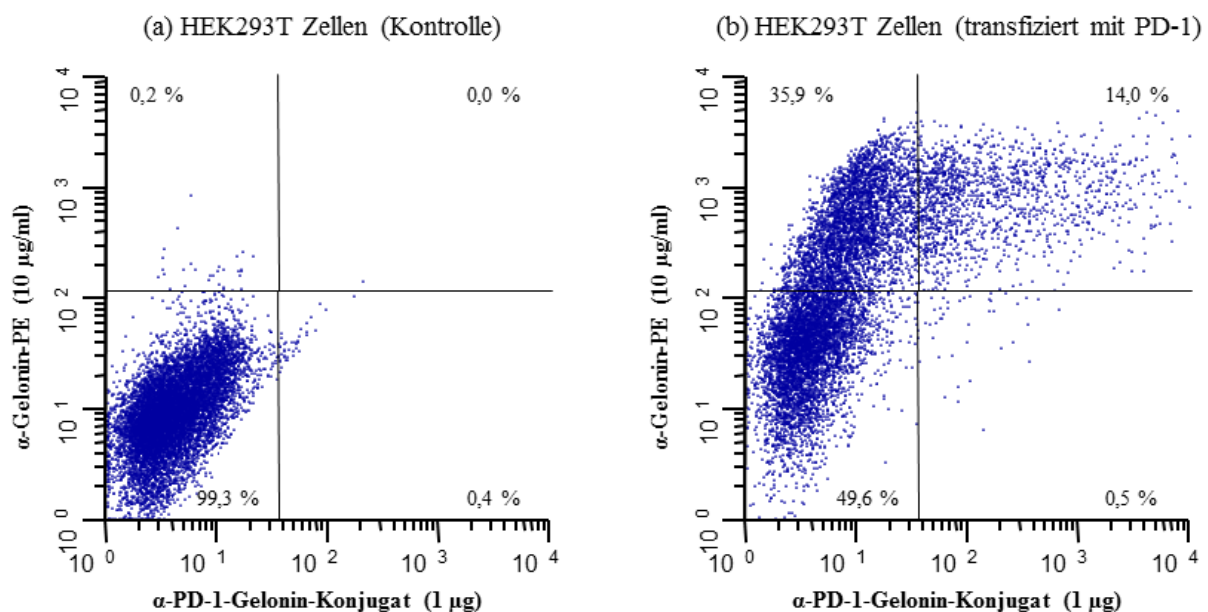


Abbildung 3.23: Überprüfung der Bindungsaffinität des anti-PD-1-Gelonin-Konjugats über den anti-Gelonin-Antikörper mittels Durchflusszytometrie: (a) Ergebnis der nicht transfizierten Zellen (350000/Ansatz); (b) Ergebnis der transfizierten Zellen (350000/Ansatz). Die Zellen wurden mit dem Konjugatgemisch (1 μg /Ansatz) inkubiert. Als Primärantikörper diente der Maus-anti-Gelonin-IgG₁-Antikörper (Klon E3) und als Sekundärantikörper wurde Ratte-anti-Maus-IgG₁-Biotin (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit SA-PE (Verdünnung 1/800).

Das Ergebnis der nicht transfizierten Zellen (Graph (a)) zeigt auch hier, dass die lebenden Zellen zu ~ 99 % negativ sind. Das bedeutet, das Konjugat und der Antikörper konnten nicht an die Zellen binden, da diese kein PD-1 exprimieren. Im Vergleich mit Abbildung 3.22

3. Eigene Ergebnisse und Diskussion

wurde hier aber für die mit PD-1 transfizierten Zellen (Graph (b)) ein anderes Ergebnis erzielt. Hier sind ~ 36 % der lebenden Zellen positiv auf die Reaktion mit dem Konjugat und ~ 50 % negativ. Das Ergebnis ist somit nicht eindeutig und eher als negativ zu werten. Beim Einsatz von 5 und 10 µg Konjugatgemisch (Daten hier nicht gezeigt) wurde ein ähnliches Ergebnis erhalten. Der Maus-anti-Gelonin-IgG₁-Antikörper (Klon E3) war für einen eindeutigen Nachweis der Bindungsaffinität auch nicht geeignet. Vermutlich war seine Affinität für den Einsatz in diesem Experiment nicht hoch genug. Eine letzte Möglichkeit zur genauen Bestimmung der Bindungsaffinität des anti-PD-1-Antikörpers im Konjugat bot der Einsatz des Maus-anti-His-IgG₁ als Primärantikörper zur Detektion des His-Tags im Konjugat. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.24 dargestellt.

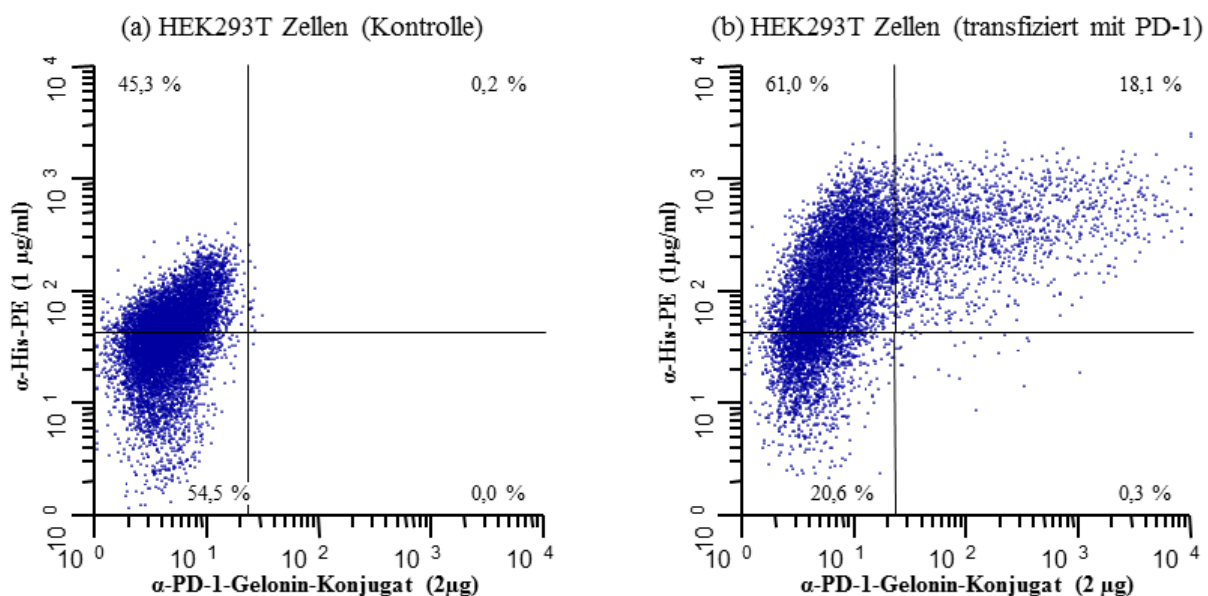


Abbildung 3.24: Überprüfung der Bindungsaffinität des anti-PD-1-Gelonin-Konjugats über den anti-His-Antikörper mittels Durchflusszytometrie: (a) Ergebnis der nicht transfizierten Zellen (200000 Zellen/Ansatz); (b) Ergebnis der transfizierten Zellen (200000 Zellen/Ansatz). Die Zellen wurden mit dem Konjugatgemisch (2 µg/Ansatz) inkubiert. Als Primärantikörper diente der Maus-anti-His-IgG₁ und als Sekundärantikörper wurde Ratte-anti-Maus-IgG₁-Biotin (1 µg/ml) eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit SA-PE (Verdünnung 1/800).

Bei diesem Versuch waren bei der Kontrolle (Graph (a)) ~ 45 % der lebenden Zellen positiv und ~ 55 % negativ. Das Ergebnis ist nicht so eindeutig wie zuvor. Vermutlich kam es hier zu Kreuzreaktionen der Antikörper mit anderen Oberflächenproteinen der Zellen. In Graph (b) wurden aber ~ 61 % der lebenden Zellen positiv auf die Reaktion mit dem Konjugat getestet und nur ~ 21 % negativ. Da die Kontrolle aber auch eine positive Reaktion zeigte konnte dieses Ergebnis nicht als eindeutig angesehen werden. Es wurde aber trotzdem davon

ausgegangen, dass der anti-PD-1-AK im Konjugat noch an PD-1 binden kann. Weitere Möglichkeiten einer eindeutigen Überprüfung gab es nicht, da sowohl die Antikörper als auch das Konjugat nur in begrenzter Menge vorlagen. Außerdem wäre es besser, reines Konjugat für die Versuche einzusetzen, um ein eindeutiges Ergebnis zu erhalten.

3.1.5.2 Untersuchungen zur Wirkung des Konjugats *in vitro*

Obwohl die Versuche zur Untersuchung der Bindungsaffinität des Konjugats kein eindeutiges Ergebnis lieferten, sondern lediglich eine positive Tendenz, wurde die Wirksamkeit des Konjugats *in vitro* untersucht. Die Durchführung ist ausführlich in Kapitel 5.4.3.2 beschrieben. Es wurden nicht transfizierte HEK293T Zellen (100000/Ansatz) (Kontrolle) und mit PD-1 transfizierte HEK293T Zellen (100000/Ansatz) kultiviert und für 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen des Konjugatgemischs (0, 1, 5 und 50 µg/ml) inkubiert. Anschließend wurden sie geerntet und mittels Durchflusszytometrie (siehe Kap. 5.4.3) die Mortalitätsrate des Konjugats bestimmt. Hierzu wurde den Zellen Propidiumiodid zugesetzt, um die Zahl der toten Zellen zu ermitteln. Das Ergebnis (Daten hier nicht dargestellt) zeigte, dass in der Kontrolle der Anteil der lebenden Zellen nach der Behandlung 99-100 % betrug. Bei den transfizierten Zellen betrug der Anteil der lebenden Zellen 89-90 %. Es wurde bei keiner Konjugatkonzentration eine signifikante Wirkung auf die Zellen festgestellt, da die Mortalität nur 10 % betrug.

Um eine Wirkung des Konjugats doch noch nachzuweisen, wurde ein weiterer Versuch mit anderen Zellen unternommen. Hierzu sollen frisch isolierte Milzzellen und Lymphozyten mit unterschiedlichen Konjugatkonzentrationen (0, 1, 5 und 50 µg/ml) behandelt werden. Vor der Behandlung mussten die Zellen dazu angeregt werden, PD-1 an ihrer Oberfläche zu exprimieren. Sie wurden mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA, 10 ng/ml) und Ionomycin (500 ng/ml) stimuliert und mittels Durchflusszytometrie und dem anti-PD-1-Antikörper auf die Expression von PD-1 untersucht. Es konnte keine Expression von PD-1 festgestellt werden und die Zellen wurden nicht mit dem Konjugatgemisch behandelt. Auch eine Wiederholung der Stimulation führte nicht zum Erfolg. Ein Grund hierfür könnte sein, dass die frisch aus der Milz und den Lymphknoten einer Maus isolierten Zellen in Kultur schnell absterben die Stimulation aber erst nach zwei Tagen getestet wurde. Zu diesem Zeitpunkt war die Mortalität bereits zu hoch.

Weitere Versuche zur Untersuchung der Wirksamkeit waren während des Aufenthalts in León nicht mehr möglich. Das Experiment mit der Behandlung der HEK293T Zellen sollte aber nochmals mit weiteren Konzentrationen und längeren Behandlungszeiträumen wiederholt werden. Am besten wäre es, hierbei reines Konjugat einzusetzen und vorher noch einmal die Bindungsaffinität zu testen. Dann könnte ausgeschlossen werden, dass eine Veränderung der Bindungsaffinität der Grund für die fehlende Wirkung des Konjugats ist. Weitere Gründe könnten sein, dass das Konjugat vielleicht trotz Bindung an PD-1 nicht in die Zelle gelangt, weil es nicht zur Endozytose kommt. Außerdem könnte die Toxizität von Gelonin bei der Kopplungsreaktion beeinträchtigt worden sein. Hierzu wurde ein *in-vitro*-Translationsassay durchgeführt (siehe Kap. 3.1.5.3).

3.1.5.3 Überprüfung der Toxizität des Konjugats mittels des *in-vitro*-Translationsassays

Ob die Kopplungsreaktion die Toxizität von Gelonin beeinträchtigt, wurde mittels des *in-vitro*-Translationsassays in einem zellfreien System überprüft. Hierzu wurde Kaninchen-Retikulozyten-Lysat, das alle für die Proteinbiosynthese benötigten zellulären Bestandteile enthält, eingesetzt (Pelham und Jackson, 1976; Jackson *et al.*, 1983). Die genaue Durchführung ist in Kapitel 5.5.7 beschrieben.

Es wurden Verdünnungsreihen mit 7 unterschiedlichen Konzentrationen ($1 \cdot 10^{-6,5}$, $1 \cdot 10^{-7,5}$, $1 \cdot 10^{-8}$, $1 \cdot 10^{-8,5}$, $1 \cdot 10^{-9,5}$, $1 \cdot 10^{-10,5}$, $1 \cdot 10^{-11,5}$ mol/l) der zu untersuchenden Proteine angesetzt. Als Negativkontrolle diente BSA und als Positivkontrolle dienten sowohl nGel als auch rGel. Als Proben wurden das Konjugatgemisch, aus dem zuvor nicht umgesetztes rGel entfernt wurde, und der anti-PD-1-AK untersucht. Alle Proben wurden mit dem Lysat und den für den Test wichtigen Reagenzien inkubiert, wobei die Synthese eines Testproteins an den Ribosomen und der Einbau der radioaktiven Aminosäure ^{14}C -Valin stattfand. Die Translation wurde nach 45 min und 65 min durch Inkubation in kaltem Wasser gestoppt und die Proteine mit TCA gefällt. Durch Filtern über 2 Whatman GF/C Filter und Waschen mit TCA wurden die ausgefallenen Proteine von nicht eingebautem radioaktiven Valin abgetrennt. Nach Zugabe von Szintillisationscocktail wurde die Radioaktivität der Filterpapiere mittels eines β -Counters bestimmt. Die Auswertung konnte mit Hilfe der Negativkontrolle erfolgen, denn BSA hemmt die Translation nicht und ist nicht toxisch für Ribosomen. Es ergab sich eine

3. Eigene Ergebnisse und Diskussion

Gerade, die 0 % Inhibition entspricht. Die Toxizität (IC_{50}) der untersuchten Proteine wurde aus dem Schnittpunkt ihrer Kurve mit der 50 %-Inhibitorlinie bestimmt. Die erhaltenen Kurven zeigen bei 45 und 65 min einen ähnlichen Verlauf und sind exemplarisch für die Messung bei 65 min in Abbildung 3.25 dargestellt. Zur Ermittlung der Toxizität wurde der Mittelwert aus den beiden Messungen gebildet und in Tabelle 3.12 aufgeführt.

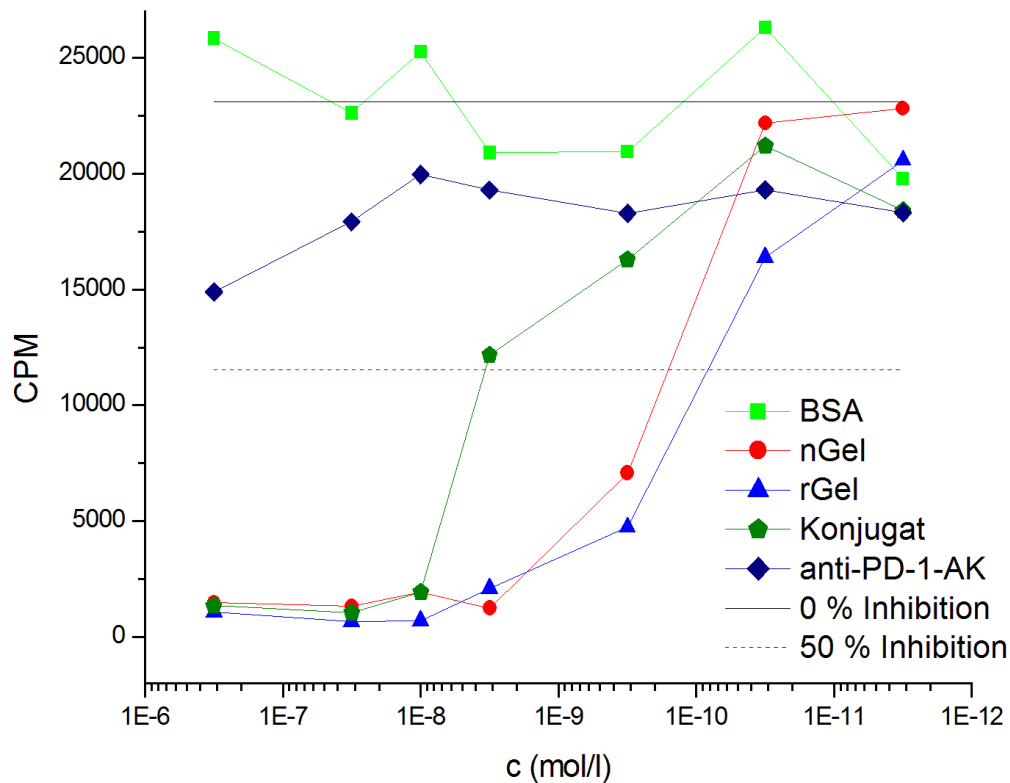


Abbildung 3.25: Ergebnis des *in-vitro*-Translationsassays zur Überprüfung der Toxizität des Konjugats nach 65 min: Die Toxizität wurde im Vergleich zu den einzelnen Konjugatbestandteilen (rGel, nGel, anti-PD-1-Ak) und der Negativkontrolle (BSA) bestimmt.

Tabelle 3.12: Ermittelte Werte für die Toxizität des Konjugats und der Konjugatkomponenten

Protein	Toxizität [ng/ml]
nGel	4,4
rGel	2,7
anti-PD-1-AK	k. A.
Konjugatgemisch	607

Für das Konjugatgemisch wurde eine Toxizität von 607 ng/ml ermittelt. Im Vergleich zu rGel mit einer Toxizität von 2,7 ng/ml ist es aber deutlich weniger toxisch. Das bedeutet, dass es während der Kopplungsreaktion zu einem drastischen Verlust von Toxizität kommt. Aber der ermittelte Wert von 607 ng/ml sollte trotzdem ausreichend sein, um die Zellen abzutöten, wenn das Konjugat in die Zellen gelangt. Das Ergebnis bestätigt also die Vermutung, dass das Konjugat nicht durch Endozytose in die Zellen aufgenommen werden kann und dies der Grund für die fehlende Wirkung auf die Zellen ist (siehe Kap. 3.1.5.2). Dies sollte bei zukünftigen Arbeiten noch überprüft werden. Für den anti-PD-1-AK konnte in diesem Assay keine Toxizität ermittelt werden, da die ermittelte Kurve keinen Schnittpunkt mit dem IC_{50} -Wert zeigt. Mit einer Toxizität von 4,4 ng/ml ist nGel etwas weniger toxisch als rGel und entspricht den ermittelten Werten von Hossann (Hossann, 2004).

3.1.5.4 Diskussion

Die Bestimmung der Bindungsaffinität des anti-PD-1-AK nach der Kopplungsreaktion mittels Durchflusszytometrie und PD-1-transfizierten HEK293T Zellen wurde mit unterschiedlichen Antikörpern durchgeführt. Der Nachweis des Konjugats über den anti-PD-1-Ak ergab eine positive Reaktion. Der Antikörper kann also noch an PD-1 binden. Da aber sowohl das Konjugat als auch der anti-PD-1-AK im Konjugatgemisch enthalten sind, konnte die Reaktion nicht eindeutig dem Konjugat zugeordnet werden. Beim Einsatz des anti-Gelonin-AK war das Ergebnis eher als negativ zu betrachten und beim Einsatz von anti-His-IgG₁-AK war das Ergebnis im Vergleich zur Kontrolle nicht eindeutig. Die Tendenz war aber positiv und es wurde davon ausgegangen, dass das Konjugat an die Zellen binden kann. Weitere Möglichkeiten zur eindeutigen Bestimmung der Bindungsaffinität gab es nicht. Die Behandlung von PD-1 transfizierten HEK293T Zellen mit verschiedenen Konjugatkonzentrationen zur Bestimmung der Mortalität war nicht erfolgreich. Die Mortalitätsrate betrug nur 10 % im Vergleich zur Kontrolle. Es wurde also keine signifikante Wirkung des Konjugats auf die Zellen nachgewiesen. Auch Versuche mit frisch isolierten Milzzellen und Lymphozyten führten nicht zum Erfolg, da hier die Stimulierung der Zellen nicht möglich war. Für das Konjugatgemisch wurde mittels des *in-vitro*-Translationsassays eine Toxizität (IC_{50}) von 607 ng/ml bestimmt. Dies bedeutet, dass die Toxizität im Vergleich zu rGel (2,7 ng/ml) durch die Kopplungsreaktion zwar drastisch verringert wird, aber sie sollte trotzdem zur Abtötung der Zellen führen. Die erhaltenen Ergebnisse weisen darauf hin, dass das Konjugat nicht in die Zelle gelangen kann, um dort seine toxische Wirkung zu entfalten. Der Grund hierfür

könnte sein, dass es bei Bindung an PD-1 nicht zur Endozytose kommt. Hierzu sollten bei zukünftigen Arbeiten noch Untersuchungen erfolgen. Des Weiteren wäre es von Vorteil alle Versuche noch einmal mit reinem Konjugat durchzuführen. Da keine Wirkung des Konjugats *in vitro* nachgewiesen werden konnte wurden die *in-vivo*-Versuche in einem Mausmodell für Hauttransplantationen nicht durchgeführt.

3.2 Herstellung und Charakterisierung eines monoklonalen anti-Gelonin-Antikörpers

Zur genaueren Charakterisierung in Western-Blot und ELISA, sowie zur Herstellung einer Affinitätssäule zur Aufreinigung des hergestellten anti-PD-1-Gelonin-Konjugats sollte in Anlehnung an die Arbeit von Zimmerman (Zimmermann, 1990; Zimmermann *et al.*, 1991) ein neuer anti-Gelonin-Antikörper synthetisiert werden. Die Herstellung erfolgte hierbei nach der erstmals 1975 von Köhler und Milstein (Köhler und Milstein, 1975) beschriebenen Hybridom-Technik (siehe Kap. 1.1.2.2). Bei dieser Methode werden kurzlebige Milzzellen von Mäusen, die mit rekombinantem Gelonin (rGel) immunisiert worden waren, mit langlebigen Myelomzellen fusioniert. Dabei entstehen „unsterbliche“ Hybridzellen, die den Antikörper produzieren. Die genaue Durchführung der einzelnen Schritte ist in Kapitel 5.5.6 beschrieben.

3.2.1 Immunisierung von BALB/c Mäusen

Der erste Schritt bei der Herstellung des monoklonalen Antikörpers ist die Immunisierung von Mäusen mit dem gemäß Kapitel 3.1.1.2 isolierten rekombinanten Gelonin ohne His-Tag. Dieser besitzt auf Grund der stark polaren Histidin-Reste eine höhere Immunogenität und könnte die Immunisierung negativ beeinflussen, da es neben der Bildung von anti-Gelonin-Antikörpern auch zur Bildung von anti-His-Antikörpern kommen kann (Hossann, 2004). Die Durchführung erfolgte wie in Kapitel 5.5.6.1 beschrieben.

Um die Immunantwort der BALB/c Mäuse gegen Gelonin zu verstärken, wurden für die Immunisierung sogenannte Adjuvantien, die zu einer Abgabe des Antigens über einen längeren Zeitraum führen, verwendet (Herbert, 1973). Für die Erstimmunisierung (*priming*) wurde das komplette Freund'sche Adjuvans (Wasser-in-Öl-Emulsion mit abgetöteten Tuberkulosebakterien) verwendet und für die Auffrischungsimmunisierungen (*boosts*) wurde

3. Eigene Ergebnisse und Diskussion

inkomplettes Freundsches Adjuvans (ohne Bakterien) eingesetzt (Freund, 1956). Die letzte Immunisierung (*final boost*) vor der Tötung der Maus wurde ohne Adjuvans durchgeführt. Die Herstellung der Gelonin-Adjuvans-Emulsion erfolgte nach Herbert und Kristensen (Herbert und Kristensen, 1986). Hierbei wurden beide Komponenten durch 20-minütiges Vortexen gemischt und zwischendurch auf Eis abgekühlt (siehe Kap. 5.5.5.1). Es wurden 5 weibliche 10 Wochen alte BALB/c Mäuse (Fa. Charles River) nach dem Immunisierungsprotokoll in Tabelle 3.13 durch intraperitoneale (i.p.) Injektion von rGel ohne His-Tag immunisiert. Als Kontrolle diente eine nicht immunisierte Maus.

Tabelle 3.13: Immunisierungsprotokoll der BALB/c Mäuse

Tag	Immunisierungsschritt	Injektion (i.p.)
0	<i>priming</i>	20 µg rGel in PBS + cFA/Maus
28	<i>boost 1</i>	10 µg rGel in PBS + iFA/Maus
62	<i>boost 2</i> ; Tod Maus Nr. 2	10 µg rGel in PBS + iFA/Maus
76	Blutprobe 1	
96	<i>boost 3</i>	10 µg rGel in PBS + iFA/Maus
131	<i>boost 4</i>	10 µg rGel in PBS + iFA/Maus
146	Blutprobe 2	
153	Tod Maus Nr. 1	
166	<i>final boost</i> Maus Nr. 4	100 µg rGel in PBS/Maus
169	Tod Maus Nr.4	
173	<i>final boost</i> Maus Nr. 5	100 µg rGel in PBS/Maus
176	Tod Maus Nr.5	
179	<i>boost 5</i>	10 µg rGel in PBS + iFA/Maus
208	<i>final boost</i> Maus Nr. 3	100 µg rGel in PBS/Maus
211	Tod Maus Nr. 3	
215	<i>final boost</i> Maus Nr.6	100 µg rGel in PBS/Maus
218	Tod Maus Nr.6	

Wie der Tabelle zu entnehmen ist, erfolgte das *Priming* mit 20 µg rGel in cFA pro Maus. Für die *Boosts* wurden 10 µg rGel in iFA pro Maus injiziert. Maus Nr. 2 verstarb leider bei *boost 2* an Tag 62. Die Kontrollmaus (Maus Nr. 1) wurde an Tag 153 getötet um eine Probefusion durchzuführen. Der *final Boost* erfolgte 3 Tage vor der Tötung der Maus durch die Injektion

3. Eigene Ergebnisse und Diskussion

von 100 µg rGel ohne Adjuvans. Die Zeit zwischen dem *final boost* und der Fusion ist für die erfolgreiche Antikörperproduktion von großer Bedeutung. Sie beeinflusst die Spezifität der Antikörper und die Zahl der bei der Fusion erhaltenen Hybriden (Bazin und Lemieux, 1988). Die Tötung der Mäuse erfolgte durch Genickbruch und es wurde die Milz entnommen. Die Milzzellen wurden präpariert (siehe Kap. 5.5.6.3) und entweder direkt zur Fusion eingesetzt oder eingefroren (siehe Kap. 5.3.2).

Zur Kontrolle, ob die Immunisierung erfolgreich war, wurden den Mäusen an Tag 76 und 146 Blutproben entnommen. Die Entnahme von 2-3 Tropfen Blut erfolgte über die Punktion der *Vena facialis* mittels einer Kanüle. Dies ist eine besonders schonende Methode, da die Mäuse keine Narkose benötigen. Das Blut wurde verdünnt, abesert, zentrifugiert und in unterschiedlichen Verdünnungen (1:50, 1:100, 1:200, 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:5000, 1:10000, 1:20000) mittels ELISA (siehe Kap. 5.4.1) auf gebildete Antikörper untersucht. Die genaue Durchführung der Blutprobenentnahme und der Blutpräparation sind in Kapitel 5.5.6.2 beschrieben. Das Ergebnis der Antikörpertiterbestimmung für die Blutprobe 1 ist in Abbildung 3.26 exemplarisch dargestellt.

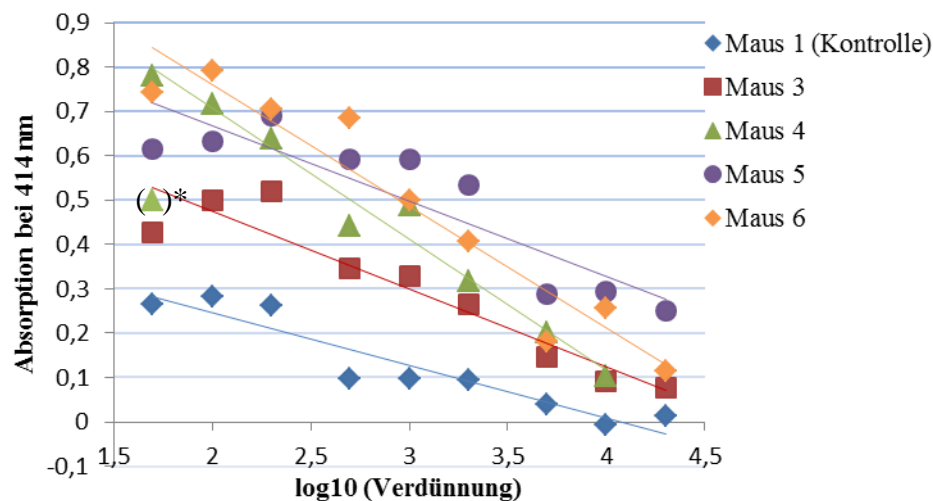


Abbildung 3.26: Ergebnis der Antikörpertiterbestimmung von Blutprobe 1 der immunisierten Mäuse mittels ELISA: Als Antigen im ELISA dienten 20 µg rGel. Als Primärantikörper wurden die unterschiedlichen Verdünnungen der Blutproben eingesetzt und zur Detektion diente der Sekundärantikörper anti-Maus-IgG-AP (F_c-spezifisch, Verdünnung: 1:1000). ()* dieser Wert wurde auf Grund der großen Abweichung für die lineare Regression nicht berücksichtigt.

Das Ergebnis zeigt, dass bei allen Mäusen im Vergleich zur nicht immunisierten Kontrollmaus (Maus Nr. 1) ein höherer Antikörpertiter vorliegt. Das bedeutet, dass die Immunisierung erfolgreich war und alle Mäuse Antikörper gegen Gelonin gebildet hatten. Der ELISA von Blutprobe 2 (Daten hier nicht gezeigt) zeigte ein ähnliches Ergebnis, so dass davon ausgegangen wurde, dass die Mäuse ausreichend immunisiert worden waren und für die Fusion eingesetzt werden konnten. Was hierbei allerdings beachtet werden musste, ist dass der Antikörpertiter kein direktes Maß für die gebildeten Antikörper produzierenden Zellen ist, sondern nur angibt, ob die Immunisierung grundsätzlich erfolgreich war. Denn der Erfolg der Fusion ist abhängig von den gebildeten B-Plasmazellen in der Milz (Anderson und Melchers, 1978).

3.2.2 Zellfusion

Nach der erfolgreichen Immunisierung erfolgte die Fusion der nach Kapitel 3.2.1 präparierten Milzzellen einer BALB/c Maus mit der Myelomzelllinie. Die hierbei verwendete Zelllinie (X63Ag8.653) besitzt eine Mutation in der HGPRT, so dass der Nebenweg der Nukleinsäuresynthese von den Myelomzellen nicht durchlaufen werden kann und die Zellen in HAT-Medium absterben, da unter diesen Bedingungen auch der Hauptweg durch Aminopterin blockiert ist. Die nach der Fusion erhaltenen Hybridome können auf Grund der genetischen Information, die sie von der B-Zelle erhalten haben, den Nebenweg durchlaufen und überleben (siehe Kap. 1.1.2.2). Die Durchführung der Fusion erfolgte nach der Anleitung von Moldenhauer (Moldenhauer, 2007) und ist in Kapitel 5.5.6.4 detailliert beschrieben.

Die Myelomzellen wurden 14 Tage vor der Fusion aufgetaut (siehe Kap. 5.3.3), kultiviert (siehe Kap. 5.3.5.2) und 3 Tage vor der Fusion noch einmal verdünnt, damit sie zum Zeitpunkt der Fusion in der stationären Wachstumsphase waren. Am Tag der Fusion wurden die Milzzellen entweder frisch präpariert (siehe Kap. 5.5.6.3) oder aufgetaut und die Myelomzellen abgeerntet. Sowohl Milz- als auch Myelomzellen wurden gewaschen und zusammen zentrifugiert. Im Anschluss erfolgte die Fusion mit PEG und die Verdünnung mit PBS, bei der die in Kapitel 5.5.6.4 angegebenen Arbeitsschritte und Zeitangaben genau zu beachten waren. Das nach der Fusion erhaltene Zellpellet wurde in HAT-Medium gelöst, die Zellsuspension in Mikrotiterplatten gefüllt und der Rest eingefroren (siehe Kap. 5.3.2). Die Zellen wurden kultiviert und die Zellkulturüberstände nach 8 bzw. 14 Tagen zuerst optisch

3. Eigene Ergebnisse und Diskussion

unter dem Mikroskop auf die Bildung von Hybridomen untersucht und dann mittels ELISA (siehe Kap. 5.4.1) auf Antikörperproduktion getestet. Die Platten wurden mit 20 µg rGel gecoatet und als Primärantikörper wurden 100 µl der Hybridomüberstände eingesetzt. Der verwendete Sekundärantikörper war anti-Maus-IgG-AP (F_c-spezifisch) in einer Verdünnung von 1:1000. Die Wells wurden wieder mit frischem Medium aufgefüllt und nach 15 Tagen erfolgte ein Mediumwechsel in allen Platten, wobei HAT-Medium durch HT-Medium ersetzt wurde.

Es wurden insgesamt 3 Fusionen wie oben beschrieben durchgeführt. Die 1. Fusion mit den Milzzellen von Maus Nr. 1 (Kontrollmaus) diente zur Probe des Ablaufs. Die 2. Fusion wurde mit den Milzzellen von Maus Nr. 4 durchgeführt. Hierbei wurden nach 14 Tagen mittels ELISA in den 12 Mikrotiterplatten 6 positive Wells identifiziert. Auf Grund einer Infektion mussten alle Platten eliminiert werden und konnten nicht weiter getestet oder kloniert werden. Um bei der 3. Fusion mit den Milzzellen von Maus Nr. 5 eine Infektion zu verhindern, wurden dem Medium in allen Schritten Antibiotika (Pen/Strep) zugesetzt. Bei dieser Fusion wurden nach 12 Tagen mittels ELISA in den 8 Mikrotiterplatten 5 eindeutig positive Wells nachgewiesen. Diese sind in Tabelle 3.14 aufgeführt.

Tabelle 3.14: Im ELISA ermittelte positive Wells von Fusion Nr. 3:

Platte	Well
P15	G6, C11
P17	H6, G7, B9

In den im ELISA positiv auf anti-Gelonin-Antikörper getesteten Wells waren auch optisch bei Betrachtung unter dem Mikroskop die Hybridome zu erkennen. Das bedeutet, dass die Fusion erfolgreich war. Die in den Wells enthaltenen positiven Hybridome wurden entweder eingefroren oder kloniert (siehe Kap. 3.2.3), um einen monoklonalen anti-Gelonin-Antikörper zu erhalten. Zwei Wochen später wurde noch einmal mittels ELISA getestet, ob noch weitere Wells positiv sind, was aber nicht der Fall war. Deshalb wurden alle Platten verworfen.

3.2.3 Klonierung positiver Hybridome

Da durch die Fusion auch Hybridome entstehen, die auf Grund von Chromosomenverlust keinen Antikörper produzieren können (*non-producer-cells*) und die Antikörper produzierenden Hybridome überwuchern könnten, ist eine frühe Selektion und Klonierung sehr wichtig. Des Weiteren können mehrere Antikörper produzierende Hybridome innerhalb einer Kultur wachsen und nur durch die Klonierung kann die Monoklonalität gewährleistet werden. Eine Kultur kann als monoklonal bezeichnet werden wenn, sie 1- bis 2-mal rekloniert wurde. Die Klonierung erfolgt hierbei nach dem Prinzip des „*limiting dilution cloning*“, bei dem die Zellen so verdünnt werden, dass statistisch nur noch eine Zelle pro Napf enthalten ist (Peters und Baumgarten, 1990; Dübel, 2007). Die genaue Durchführung ist in Kapitel 5.5.6.6 beschrieben.

Für die Klonierung nach der limitierenden Verdünnung wurde das positive Well G6 der Platte 5 aus Kapitel 3.2.2 ausgewählt. Der komplette Inhalt des Wells wurde entnommen, die lebenden Zellen gezählt (siehe Kap. 5.3.4) und die Zellen mit Medium so verdünnt, dass so wenig Zellen wie möglich pro Well einer Mikrotiterplatte ausgesät wurden. Der Rest der Zellsuspension wurde als Reserve eingefroren (siehe Kap. 5.3.2). Nach 12 Tagen Kultivierung wurden die wachsenden Klone zunächst optisch unter dem Mikroskop untersucht und dann mittels ELISA (siehe Kap. 5.4.1) die Antikörperproduktion ermittelt. Die Platten wurden mit 20 µg rGel gecoatet und 100 µl der Hybridomüberstände als Primärantikörper eingesetzt. Als Sekundärantikörper wurde anti-Maus-IgG-AP (F_c-spezifisch, Verdünnung 1:1000) eingesetzt. Der ELISA der Klonierung von P15 G6 ergab 6 eindeutig positive Wells. Es wurden also 6 positive Klone erhalten, die in Tabelle 3.15 aufgeführt sind. Die positiven Klone wurden entweder ein 2. Mal kloniert oder eingefroren.

Tabelle 3.15: Im ELISA bestimmte positive Wells der 1. Klonierung:

Fusionsplatte	Hybridomwell	Klonierungswell
P15	G6	F3, F4, A8, H10, C11, F11

Der positive Klon P15 G6 H10 wurde ein 2. Mal nach dem Prinzip des „*limiting dilution cloning*“ wie oben beschrieben kloniert und kultiviert. Nach 6 Tagen wurden die wachsenden Klone wieder optisch untersucht und mittels ELISA auf Antikörperproduktion getestet. Es wurden die 8 in Tabelle 3.16 aufgeführten, eindeutig positiven Klone nachgewiesen, die

3. Eigene Ergebnisse und Diskussion

entweder für die Antikörperproduktion eingesetzt (siehe Kap. 3.2.4) oder als Reserve eingefroren wurden. Auf Grund der erfolgreichen 1. und 2. Klonierung wurde angenommen, dass die erhaltenen anti-Gelonin-Antikörper monoklonal sind. Um dies zu spezifizieren wurden die Klone vervielfältigt.

Tabelle 3.16: Im ELISA ermittelte positive Klone nach der 2. Klonierung:

Fusionsplatte	Hybridomwell	1. Klonierung	2. Klonierung
P15	G6	H10	F3, E3, E4, C5, F5, G7, H8, G9

3.2.4 Antikörperproduktion

Nach der erfolgreichen Klonierung erfolgte die Vervielfältigung von zwei auf die Produktion des anti-Gelonin-Antikörpers positiv getesteten Klonen (P15 G6 H10 E3 und P15 G6 H10 C5), um eine größere Menge Antikörper zu erhalten. Dabei wurden die zwei im Folgenden beschriebenen Methoden angewendet.

3.2.4.1 Antikörperproduktion *in vitro*

Eine Möglichkeit zur Produktion großer Mengen Antikörper ist die Vermehrung der positiven Klone, die zur Vereinfachung hier nur noch E3 und C5 genannt werden, in der Zellkultur und die anschließende Isolierung aus dem Zellkulturüberstand. Bei dieser Methode wurden die Hybridomzellen eines Napfes in größere Volumina expandiert, um sich zu vermehren und größere Antikörpermengen zu produzieren. Die genaue Durchführung ist in Kapitel 5.5.6.7.1 beschrieben.

Der komplette Inhalt eines Wells wurde entnommen, die Zellzahl bestimmt (siehe Kap. 5.3.4) und ein Teil der Zellsuspension in unterschiedliche Volumina überführt. Der Rest der Zellsuspension wurde als Reserve eingefroren (siehe Kap. 5.3.2). Der Klon E3 wurde in eine 25-cm²-Zellkulturflasche (5 ml Medium) überführt und der Klon C5 in eine 24-Well-Mikrotiterplatte (1 ml Medium). Nach 7 Tagen wurden die Überstände der beiden Klone mittels ELISA (siehe Kap. 5.4.1) auf Antikörperproduktion untersucht. Die Platten wurden mit 20 µg rGel gecoatet und 100 µl der Hybridomüberstände als Primärantikörper eingesetzt. Als Sekundärantikörper wurde anti-Maus-IgG-AP (F_c-spezifisch, Verdünnung 1:1000) eingesetzt.

Der Test war für beide Klone positiv, das bedeutet, sie produzieren noch den anti-Gelonin-Antikörper. Deshalb wurden beide Klone in ein größeres Volumen überführt, der Klon E3 in eine 75-cm²-Zellkulturflasche (50 ml) und ein positiver Napf der 24-Well-Platte des Klons C5 in eine 25-cm²-Zellkulturflasche (5 ml). Die anderen Wells wurden als Reserve eingefroren. Nach 7 Tagen wurde mittels ELISA erneut die Antikörperproduktion getestet. Der Test war für beide Klone positiv und der Klon C5 wurde auch in eine 75-cm²-Flasche überführt. Die beiden Klone wurden weiter kultiviert und alle 7 Tage wurde der Überstand gesammelt und das Medium gewechselt. Wie mittels ELISA nachgewiesen werden konnte war die Antikörperproduktion *in vitro* für beide Klone möglich und der Überstand konnte zur Isotypisierung und zur Isolierung eingesetzt werden.

3.2.4.2 Antikörperproduktion *in vivo*

Eine weitere Möglichkeit ist die Vermehrung der positiven Klone in der Bauchhöhle der Maus und die anschließende Isolierung aus der Aszitesflüssigkeit. Bei dieser Methode werden die zuvor in der Zellkultur kultivierten Hybridomzellen eines Klons in die Bauchhöhle der Maus injiziert. Nachdem sich ausreichend Flüssigkeit in der Bauchhöhle gesammelt hat wird diese durch Punktion entnommen und der Antikörper kann daraus isoliert werden. Ein Vorteil der Methode ist, dass die Antikörperkonzentration in der Aszitesflüssigkeit höher ist als in der Zellkultur, deshalb können größere Mengen isoliert werden. Ein Nachteil ist aber auch, dass sich in der Flüssigkeit auch andere Antikörper, die von der Maus produziert werden, befinden. Die Durchführung ist in Kapitel 5.5.6.7.2 ausführlich beschrieben.

Vor der Immunisierung wurden die Hybridomzellen des Klons C5 für 2 Wochen kultiviert. Außerdem wurden die 4 Mäuse durch die intraperitoneale Injektion von 0,5 ml Pristan vorbereitet. Am Tag der Immunisierung wurden die Zellen abgeerntet (siehe Kap. 5.3.5.2), die Zellzahl bestimmt (siehe Kap. 5.3.4) und die Zellen in PBS resuspendiert. Es wurden pro Maus 2 ml der Suspension (2×10^6 Zellen) i.p. injiziert. Nach 18 Tagen war bei allen Mäusen die Ansammlung von Flüssigkeit in der Bauchhöhle sichtbar und die Mäuse wurden getötet. Die Aszitesflüssigkeit wurde gesammelt und 4 Tage gelagert. Von den 3 gebildeten Phasen wurde die obere Ölphase verworfen und der Überstand und die Zellen zentrifugiert. Der nach der Zentrifugation erhaltene Überstand wurde für die Protein-G-Affinitätschromatographie (siehe Kap. 5.5.6.10) eingesetzt, um den Antikörper zu isolieren.

3.2.5 Isotypisierung des Antikörpers

Wie in Kapitel 1.1.2 beschrieben werden Antikörper auf Grund ihrer strukturellen und funktionellen Eigenschaften in fünf Hauptklassen, sogenannte Isotypen, eingeteilt: IgG, IgM, IgA, IgD und IgE. Die Antikörperklasse IgG wird beim Menschen (IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄) und bei der Maus (IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃) in unterschiedliche Subklassen unterteilt. Außerdem wird die Antikörperklasse IgA beim Menschen in zwei Subklassen eingeteilt: IgA₁ und IgA₂ (Janeway *et al.*, 2009).

Eine Isotypisierung des produzierten anti-Gelonin-Antikörpers war nötig, um die beste Methode zur Isolierung und Aufreinigung des Antikörpers aus dem Zellkulturüberstand oder der Aszitesflüssigkeit zu wählen. Die Durchführung erfolgte mittels „IsoQuick™ Strips for Mouse Monoclonal Isotyping“ (Fa. Sigma) nach Angaben des Herstellers. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.27 dargestellt.

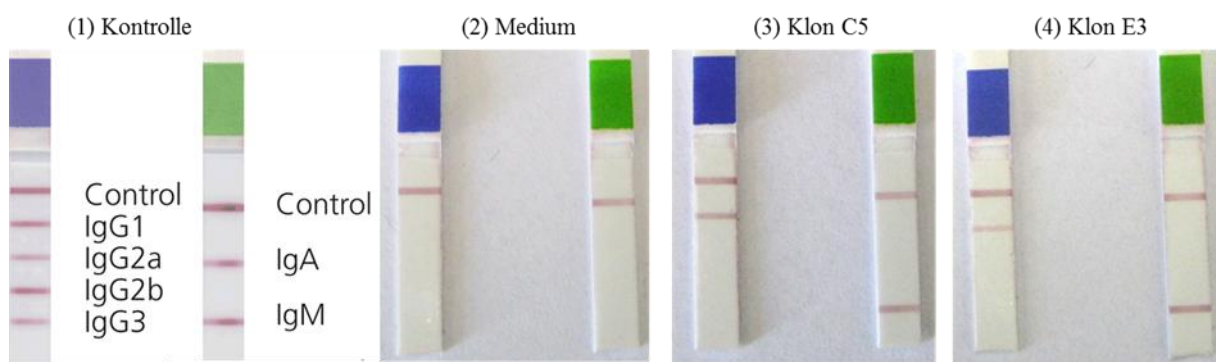


Abbildung 3.27: Isotypisierung der Antikörperklone mittels „IsoQuick™ Strips for Mouse Monoclonal Isotyping“: (1) Vergleichsmaßstab (Kontrolle) der Teststreifen (Fa. Sigma): Nachweis von IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃ (blaue Teststreifen) und von IgA, IgM (grüne Teststreifen); (2) Ergebnis der Isotypisierung des Mediums; (3) Ergebnis der Isotypisierung des Klons C5; Ergebnis der Isotypisierung des Klons E3.

Die Isotypisierung ergab, dass im Kulturmedium keine Antikörper enthalten sind. Die Überstände der Antikörperklone C5 und E3 enthalten beide sowohl IgG₁ als auch IgM Antikörper. Da im Medium keine Antikörper nachgewiesen wurden, müssen beide Antikörper von der Maus gebildet worden sein. Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurde ein ELISA (siehe Kap. 5.4.1) sowohl mit IgG- als auch mit IgM-Antikörpern durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.28 dargestellt.

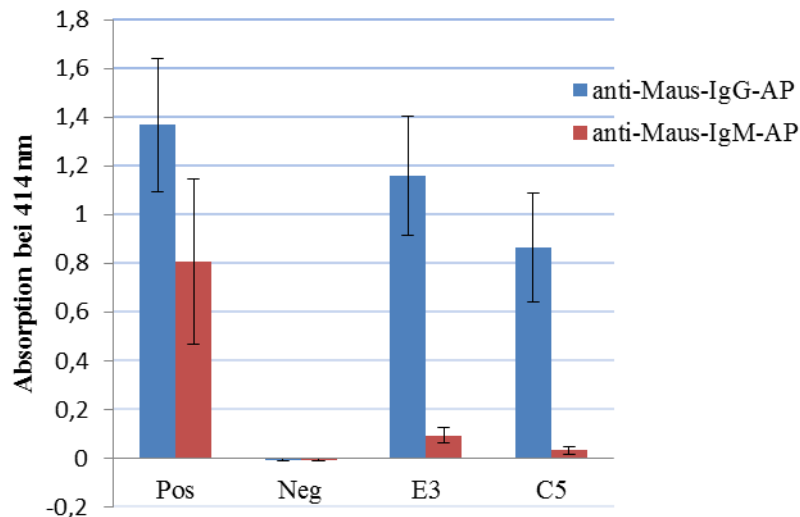


Abbildung 3.28: Ergebnis der Isotypisierung der hergestellten Antikörper mittels ELISA: Als Antigen im ELISA dienten 20 µg rGel. Als Primärantikörper wurden die beiden Antikörperklone E3 (Verdünnung 1:500 und C5 (Verdünnung 1:1000) eingesetzt und zur Detektion dienten die Sekundärantikörper anti-Maus-IgG-AP (Verdünnung 1:1000) und anti-Maus-IgM-AP (F_c -spezifisch, Verdünnung 1:1000). Im Diagramm ist die nach 10 min gemessene Absorption dargestellt.

Der ELISA bestätigt im Vergleich mit der Positivkontrolle (rGel detektiert mit dem Primärantikörper Maus-anti-His 1:1000) und der Negativkontrolle (BSA), dass die in den beiden Antikörperüberständen enthaltenen IgG₁-Antikörper gegen Gelonin gerichtet sind. Das Ergebnis für IgM war negativ, deshalb ist der IgM-Antikörper kein anti-Gelonin-Antikörper. Auf Grund dieser Ergebnisse wurde die Protein-G-Affinitätschromatographie als Isolierungsmethode für den Antikörper gewählt.

3.2.6 Isolierung und Aufreinigung des Antikörpers mittels Protein-G-Affinitätschromatographie

Da die Isotypisierung ergab, dass es sich bei den in den Überständen enthaltenen anti-Gelonin-Antikörperklonen C5 und E3 um IgG₁-Antikörper handelt, wurde als Isolierungsmethode die Protein-G-Affinitätschromatographie gewählt. Bei Protein G handelt es sich um ein Zelloberflächenprotein aus Streptokokken der Gruppe G, das eine spezifische Affinität zur F_c -Region von Immunglobulinen der Klasse G (IgG) besitzt. Die IgG₁-Antikörper binden während der Isolierung an Protein G, werden bei niedrigem pH wieder eluiert und können somit aufgereinigt werden. Auch der im Überstand enthaltene IgM-Antikörper kann mit dieser Methode gut von dem IgG₁-Antikörper abgetrennt werden, da dieser nicht an Protein G binden kann (Peters und Baumgarten, 1990; Akerström *et al.*, 1985). Diese Methode ist

sowohl für die Isolierung aus dem Zellkulturüberstand (siehe Kap. 3.2.6.1) als auch für die Isolierung aus Aszites (siehe Kap. 3.2.6.2) geeignet.

3.2.6.1 Isolierung aus dem Zellkulturüberstand

Die Zellkulturüberstände wurden gesammelt und die Isolierung der Antikörper wie in Kapitel 5.5.6.9 beschrieben durchgeführt. Der Überstand (50 ml) wurde zentrifugiert, auf pH 7,4 eingestellt, sterilfiltriert und auf die äquilibrierte Protein-G-Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte bei einem pH-Wert von 2,7. Die einzelnen Fraktionen wurden sofort neutralisiert, da der Antikörper sonst denaturiert wird. Nach erneuter pH-Wert-Kontrolle wurden die Fraktionen, die vermutlich den Antikörper enthielten mittels des Chromatogramms (hier nicht gezeigt) zugeordnet, vereinigt und charakterisiert.

3.2.6.1.1 Charakterisierung

Die Charakterisierung der vereinigten Fraktionen erfolgte mittels SDS-PAGE (siehe Kap. 5.2.2) und BCA-Test (siehe Kap. 5.2.1.2), sowie immunologisch mittels ELISA (siehe Kap. 5.4.1) und Western-Blot (siehe Kap. 5.4.2) Das Ergebnis der SDS-PAGE ist in Abbildung 3.29 dargestellt.

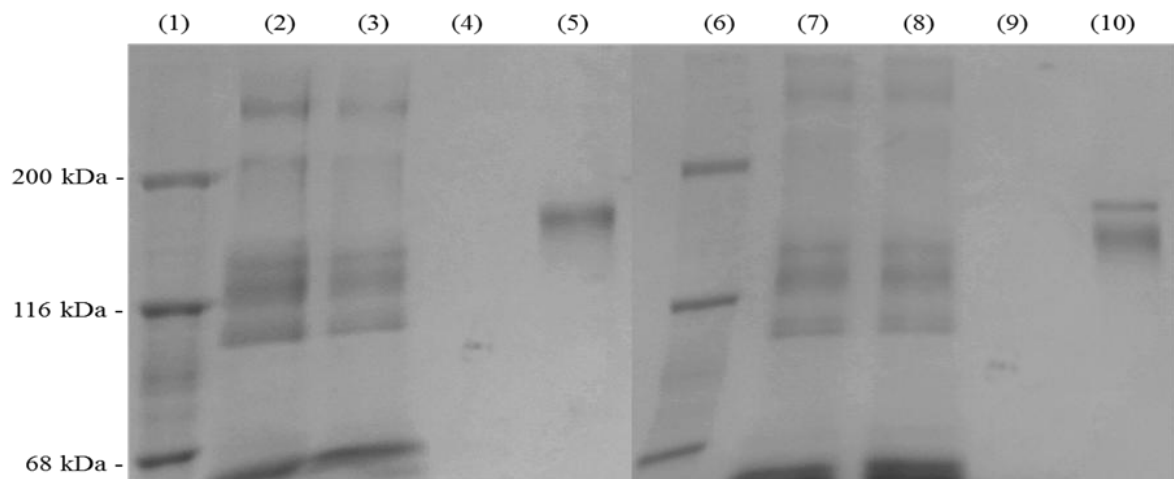


Abbildung 3.29: SDS-PAGE (7%iges Trenngel, nicht reduzierende Bedingungen) der gesammelten Fraktionen während der Protein-G-Affinitätschromatographie: In Bahn 1-5 sind die Ergebnisse des Antikörperklons E3 dargestellt. Bahn (1): Proteinmarker; Bahn (2): Hybridomüberstand von E3 nach dem 1. Durchlaufen der Säule (10 µl); Bahn (3): Hybridomüberstand von E3 nach dem 2. Durchlaufen der Säule (10 µl); Bahn (4): Waschfraktion (10 µl); Bahn (5): Elutionsfraktion (10 µl); In Bahn 6-10 sind die Ergebnisse des Antikörperklons C5 dargestellt. Bahn (6): Proteinmarker; Bahn (7): Hybridomüberstand von C5 nach dem 1. Durchlaufen der Säule (10 µl); Bahn (8): Hybridomüberstand von C5 nach dem 2. Durchlaufen der Säule (10 µl); Bahn (9): Waschfraktion (10 µl); Bahn (10): Elutionsfraktion (10 µl).

3. Eigene Ergebnisse und Diskussion

Das SDS-Gel des Antikörperklons E3 zeigt, dass die Aufreinigung des Antikörpers erfolgreich war, denn es ist nur noch eine Bande in Bahn (5) sichtbar. Da die Bande in der Nähe der Markerbande von 200 kDa liegt und das charakteristische Molekulargewicht für IgG-Antikörper 150 kDa ist (Janeway *et al.*, 2009), handelt es sich wahrscheinlich um den anti-Gelonin-Antikörper. Das SDS-Gel von Antikörperklon C5 zeigt in Bahn (10) noch zwei Banden, die im für einen IgG-Antikörper charakteristischen Molekularbereich liegen. Es kann also nicht genau bestimmt werden welche Bande zum anti-Gelonin-Antikörper gehört. Die Aufreinigung war aber auch hier grundsätzlich erfolgreich. Um die Ergebnisse der SDS-PAGE zu bestätigen und nachzuweisen ob der IgM-Antikörper entfernt werden konnte, wurde ein ELISA durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.30 dargestellt.

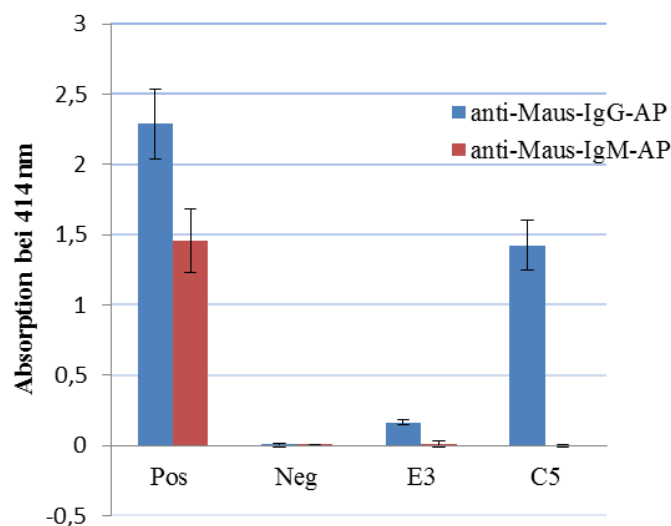


Abbildung 3.30: Ergebnis der Isotypisierung nach der Säule mittels ELISA: Als Antigen im ELISA dienten 20 µg rGel. Als Primäranantikörper wurden die beiden Antikörperklone E3 (Verdünnung 1:500 und C5 (Verdünnung 1:1000) eingesetzt und zur Detektion dienten die Sekundäranantikörper anti-Maus-IgG-AP (Verdünnung 1:1000) und anti-Maus-IgM-AP (F_c-spezifisch, Verdünnung 1:1000). Im Diagramm ist die nach 10 min gemessene Absorption dargestellt.

Das Ergebnis des ELISA zeigt im Vergleich mit der Positivkontrolle (rGel detektiert mit dem Primäranantikörper Maus-anti-His 1:1000) und der Negativkontrolle (BSA), dass der Antikörperklon C5 noch positiv für IgG-Antikörper ist. Das bedeutet, es handelt sich um einen anti-Gelonin-Antikörper. Der Antikörperklon E3 zeigt nur noch eine schwach positive Reaktion, während der Isolierung kam es also zu einem Aktivitätsverlust. Trotzdem handelt es sich um einen anti-Gelonin-Antikörper. Der Test auf IgM-Antikörper ist für beide Klone negativ, diese wurden also durch die Isolierung entfernt. Zur endgültigen Bestätigung, dass es sich bei den 2 isolierten Antikörpern um anti-Gelonin-Antikörper handelt wurde noch ein

3. Eigene Ergebnisse und Diskussion

Western-Blot durchgeführt. Hierbei wurden unterschiedliche Konzentrationen von rGel eingesetzt und nach dem Transfer auf die Membran einer Detektion mit den Antikörperklonen E3 (Verdünnung 1:500) und C5 (Verdünnung 1:1000) unterzogen. Als Sekundärantikörper wurde anti-Maus-IgG-AP (F_c-spezifisch, Verdünnung 1:1000) verwendet. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.31 dargestellt.

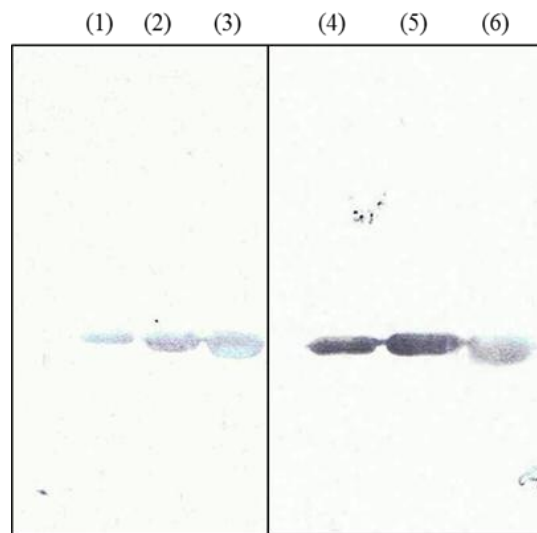


Abbildung 3.31: Ergebnis des Western-Blots mit rekombinalem Gelonin (rGel): In Bahn 1-3 sind die Ergebnisse des Antikörperklons E3 dargestellt. Bahn (1): rGel (50 µg); Bahn (2): rGel (100 µg); Bahn (3): rGel (150 µg). In Bahn 4-6 sind die Ergebnisse des Antikörperklons C5 dargestellt. Bahn (4): rGel (50 µg); Bahn (5): rGel (100 µg); Bahn (6): rGel (150 µg).

Der Western-Blot von Klon E3 (Bahn 1-3) zeigt, dass eine Detektion von rGel in den 3 unterschiedlichen Verdünnungen möglich ist. Es handelt sich also um einen anti-Gelonin-Antikörper. Mit Klon C5 (Bahn 4-6) war es ebenfalls möglich, rGel in allen 3 Konzentrationen zu detektieren. Es handelt sich also auch hier um einen anti-Gelonin-Antikörper. Allerdings muss der Klon E3 im Vergleich zu C5 in einer höheren Konzentration eingesetzt werden. Er ist also nicht so affin wie Klon C5. Des Weiteren wurde in einem Western-Blot getestet, ob mit den erhaltenen anti-Gelonin-Antikörpern auch natürliches Gelonin detektiert werden kann. Hierbei wurden unterschiedliche Konzentrationen von nGel eingesetzt und nach dem Transfer auf die Membran einer Detektion mit den Antikörperklonen E3 (Verdünnung 1:500) und C5 (Verdünnung 1:1000) unterzogen. Als Sekundärantikörper wurde anti-Maus-IgG-AP verwendet. In Abbildung 3.32 ist das Ergebnis dargestellt.

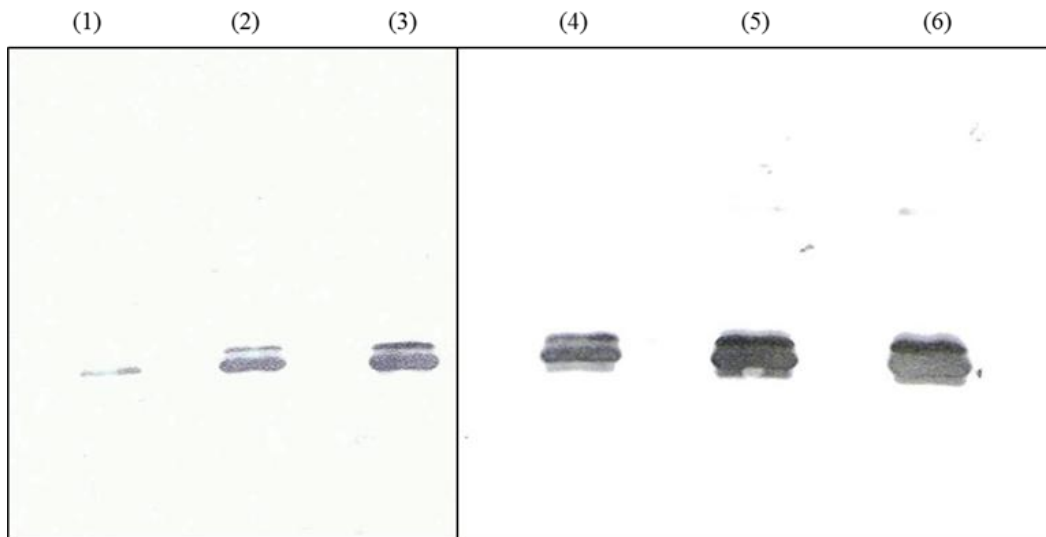


Abbildung 3.32: Ergebnis des Western-Blots mit natürlichem Gelonin (nGel): In Bahn 1-3 sind die Ergebnisse des Antikörperklons E3 dargestellt. Bahn (1): nGel (50 µg); Bahn (2): nGel (100 µg); Bahn (3): nGel (150 µg). In Bahn 4-6 sind die Ergebnisse des Antikörperklons C5 dargestellt. Bahn (4): nGel (50 µg); Bahn (5): nGel (100 µg); Bahn (6): nGel (150 µg).

Das Ergebnis des Western-Blots für Klon E3 (Bahn 1-3) zeigt, dass auch nGel mit dem anti-Gelonin-Antikörper detektiert werden kann. Auch mit Klon C5 (Bahn 4-6) ist dies möglich. Es zeigt sich auch hier, dass Klon E3 in einer höheren Konzentration eingesetzt werden muss als C5. Beide Antikörperklone sind nicht nur spezifisch für rGel sondern auch für nGel. Des Weiteren ist mit beiden Antikörperklonen noch eine Bande oberhalb der Geloninbande detektiert worden. Hierbei handelt es sich vermutlich um GAP 31, das eine molekulare Masse von ca. 31 kDa hat und eine höhere Glykosylierung wie Gelonin besitzt (Nolan *et al.*, 1993; Rosenblum *et al.*, 1995). Es wurde zusammen mit nGel aus *Gelonium multiflorum* isoliert (Badr, 2012). Mittels des BCA-Tests wurde die Konzentration der erhaltenen Antikörper bestimmt. Es wurden insgesamt 0,3 mg des Klons C5 aus 60 ml Hybridomüberstand isoliert. Die Isolierung von Klon E3 ergab 1,6 mg aus 220 ml.

3.2.6.1.2 Diskussion

Die Isolierung der anti-Gelonin-Antikörper aus dem Zellkulturüberstand der Klone E3 und C5 mittels Protein-G-Affinitätschromatographie war erfolgreich. Dies konnte durch die SDS-PAGE, bei der sich nur noch eine Bande (Klon E3) bzw. zwei Banden (Klon C5) im für IgG-Antikörper charakteristischen Bereich von 150 kDa befanden, bestätigt werden. Ein ELISA zeigte, dass es sich bei beiden Antikörpern um anti-Gelonin-Antikörper handelt. Es konnte aber hierbei auch ein Aktivitätsverlust von Klon E3 beobachtet werden. Eine endgültige Bestätigung, dass es sich bei den isolierten Klonen um anti-Gelonin-Antikörper handelt,

lieferte ein Western Blot. Hierbei wurde gezeigt, dass Klon C5 eine höhere Affinität besitzt als E3. Beide Klone detektieren auch natürliches Gelonin.

3.2.6.2 Isolierung aus der Aszitesflüssigkeit

Die Aszitesflüssigkeit wurde gesammelt und der Antikörper wie in Kapitel 5.5.6.10 beschrieben mittels Protein-G-Affinitätschromatographie isoliert. Die in Kapitel 3.2.4.2 produzierte Aszitesflüssigkeit wurde direkt auf eine äquilibrierte Protein-G-Säule gegeben, die Säule verschlossen und für 4 h auf einem Rotator inkubiert. Nachdem der Überstand die Säule passiert hatte, erfolgte die Elution des Antikörpers bei pH 2,7. Die Fraktionen wurden in Neutralisierungspuffer (pH 9) enthaltenden Gefäßen gesammelt und sofort neutralisiert. Im Anschluss wurden die Fraktionen charakterisiert.

3.2.6.2.1 Charakterisierung

Die Charakterisierung der Fraktionen erfolgte durch die Bestimmung der Konzentrationen mittels UV-Vis-Spektroskopie (siehe Kap. 5.2.1.1). Der Vorteil ist, dass nur ein kleiner Tropfen der Probe für die Messung benötigt wird um die Konzentration zu bestimmen. Das Ergebnis ist in Tabelle 3.17 dargestellt.

Tabelle 3.17: Konzentrationsbestimmung der Fraktionen mittels Nano Drop

Fraktion	Konzentration [mg/ml]
1	0,2
2	0,2
3	0,1
4	0,1
5	0,2
6	0,0

Es wurden nur sehr geringe Konzentrationen von Antikörper in den Fraktionen nachgewiesen, deshalb wurde auf eine weitere Charakterisierung verzichtet. Weiterhin wurde davon ausgegangen, dass die Antikörperproduktion *in vivo* nicht funktioniert hat, da hier sonst größere Mengen an Antikörper erhalten werden.

3.2.6.2.2 Diskussion

Es wurden insgesamt nur 0,8 mg Antikörper isoliert. Diese geringe Menge deutet darauf hin, dass die Antikörperproduktion *in vivo* nicht funktioniert hat. Ein Grund hierfür könnte sein, dass die Tiere zu früh getötet werden mussten, da sie große Tumore entwickelt hatten. Zu diesem Zeitpunkt hatte sich vermutlich noch nicht ausreichend Antikörper gebildet.

3.2.7 Bestimmung des Antikörpertiters

Um die Nachweisgrenze der beiden Antikörperklone E3 und C5 für rekombinantes und natürliches Gelonin zu bestimmen, wurde ein ELISA durchgeführt. Für die Titerbestimmung wurden die beiden Antikörper zur Detektion in unterschiedlichen Verdünnungen (1:10, 1:50, 1:100, 1:200, 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:5000, 1:10000, 1:20000) eingesetzt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.33 dargestellt.

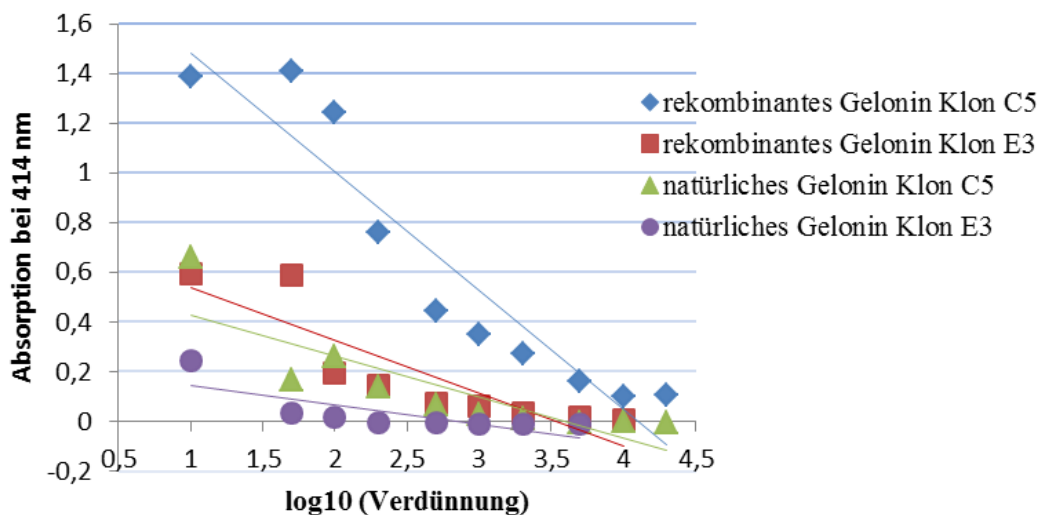


Abbildung 3.33: Ergebnis der Antikörpertiterbestimmung der zwei hergestellten Antikörper mittels ELISA: Als Antigen im ELISA dienten 20 µg rGel oder nGel. Als Primärantikörper wurden die unterschiedlichen Verdünnungen der Antikörperklone E3 und C5 eingesetzt und zur Detektion diente der Sekundärantikörper anti-Maus-IgG-AP (F_c-spezifisch, Verdünnung: 1:1000). Aufgetragen wurde die nach 12 min gemessene Absorption.

Das Ergebnis zeigt, dass Klon C5 im Vergleich zu Klon E3 bei der Detektion von rGel und nGel in einer niedrigeren Konzentration eingesetzt werden kann. Des Weiteren ist zu erkennen, dass Klon C5 spezifischer für rGel ist. Der Klon E3 zeigt keine hohe Affinität, deshalb ist Klon C5 für den Einsatz zur Detektion des anti-PD-1-Gelonin-Konjugats wahrscheinlich besser geeignet. Des Weiteren wurde die Nachweisgrenze des Klons C5

bezogen auf die Menge von rGel mittels ELISA bestimmt. Hierzu wurde die Mikrotiterplatte mit unterschiedlichen Mengen an rGel gecoatet. Als Primärantikörper diente Klon C5 (Verdünnung 1:1000) und als Sekundärantikörper anti-Maus-IgG-AP (F_c-spezifisch, Verdünnung: 1:1000). Es ergab sich eine Nachweisgrenze von 200 ng rGel für Klon C5.

3.2.8 Bestimmung der Kreuzreaktivität

Um zu testen, ob die erhaltenen anti-Gelonin-Antikörper auch mit anderen Proteinen reagieren, wurde die Kreuzreaktivität mittels ELISA (siehe Kap. 5.4.1) bestimmt. Hierbei wurde mit je 20 µg des jeweiligen Proteins gecoatet und die Antikörperklone C5 (Verdünnung 1:1000) und E3 (Verdünnung 1:500) wurden als Primärantikörper eingesetzt. Als Sekundärantikörper diente anti-Maus-IgG-AP (F_c-spezifisch, Verdünnung 1:1000). In Tabelle 3.18 sind die erhaltenen Absorptionen bei 414 nm nach 10 min dargestellt.

Tabelle 3.18: Kreuzreaktivität der hergestellten Antikörper

	Antikörperklon C5	Antikörperklon E3
rekombinantes Gelonin	0,5	0,1
natürliches Gelonin	0	0
Aprotinin	0	0
Chymotrypsin	0	0
Creatinphosphokinase	0	0
Cytochrom c	0	0
β-Galactosidase	0	0
Lysozym	0	0
Rinderserumalbumin (BSA)	0	0

Der ELISA zeigt, dass keine Kreuzreaktionen der Antikörperklone E3 und C5 mit den anderen getesteten Proteinen vorhanden sind. Beide Klone reagierten positiv auf rGel. Allerdings reagiert Klon E3 nur sehr schwach mit rGel. Ein Grund hierfür könnte sein, dass der Antikörper in einer zu geringen Konzentration eingesetzt wurde. Dies bestätigte die Bestimmung des Antikörpertiters in Kapitel 3.2.7. Die zu gering eingesetzte Konzentration ist wahrscheinlich auch der Grund für eine negative Reaktion beider Klone mit nGel. Die Kreuzreaktivität der Antikörper wurde auch mittels Western-Blot (siehe Kap. 5.4.2) überprüft.

3. Eigene Ergebnisse und Diskussion

Hierzu wurden 100 µg der unterschiedlichen Proteine eingesetzt und nach dem Transfer auf die Membran einer Detektion mit den Antikörperklonen E3 (Verdünnung 1:500) und C5 (Verdünnung 1:1000) unterzogen. Als Sekundärantikörper wurde anti-Maus-IgG-AP (F_c-spezifisch, Verdünnung 1:1000) verwendet. In Abbildung 3.34 ist das Ergebnis dargestellt.

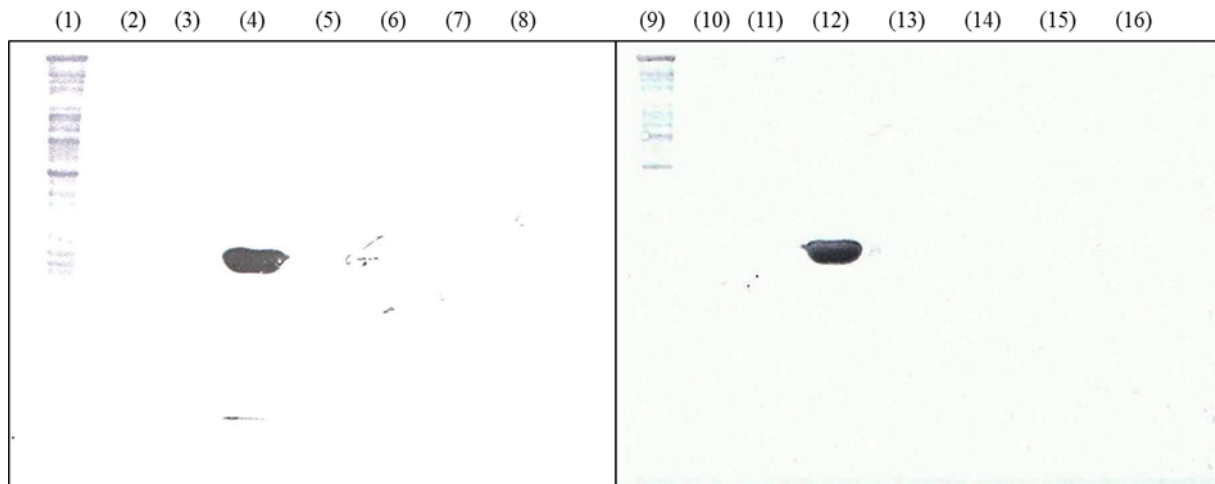


Abbildung 3.34: Ergebnis des Western-Blots zur Bestimmung der Kreuzreaktivität: In Bahn 1-8 sind die Ergebnisse des Antikörperklons E3 dargestellt. Bahn (1): Proteinmarker; Bahn (2): β -Galactosidase (100 µg); Bahn (3): BSA (100 µg); Bahn (4): rekombinantes Gelonin (100 µg); Bahn (5): natürliches Gelonin (100 µg) Bahn (6): Chymotrypsin (100 µg); Bahn (7): Lysozym (100 µg); Bahn (8): Aprotinin (100 µg). In Bahn 9-16 sind die Ergebnisse des Antikörperklons C5 dargestellt. Bahn (9): Proteinmarker; Bahn (10): β -Galactosidase (100 µg); Bahn (11): BSA (100 µg); Bahn (12): rekombinantes Gelonin (100 µg); Bahn (13): natürliches Gelonin (100 µg); Bahn (14): Chymotrypsin (100 µg); Bahn (15): Lysozym (100 µg); Bahn (16): Aprotinin (100 µg).

Der Western-Blot bestätigt das Ergebnis des ELISA, denn auch hier sind keine Kreuzreaktionen mit den getesteten Proteinen sichtbar. Nur die Banden von rGel (Bahn (4) bei E3 und Bahn (11) bei C5) sind zu sehen. Natürliches Gelonin ist auch hier nicht detektiert worden, dies liegt vermutlich an der zu geringen Antikörperkonzentration. Des Weiteren kann hier eine Kreuzreaktion beider Klone mit Proteinmarkern in Bahn (1) und (9) festgestellt werden.

3.2.9 Diskussion

Die Immunisierung von 4 BALB/c Mäusen verlief erfolgreich, wie mittels ELISA der Blutproben bestätigt wurde. Es konnten also die Milzzellen dieser Mäuse präpariert und zur Fusion eingesetzt werden. Insgesamt wurden 3 Fusionen durchgeführt wovon eine erfolgreich war und mittels ELISA 5 eindeutig positive Wells nachgewiesen wurden. Um deren Monoklonalität zu gewährleisten wurde der Inhalt von 2 positiven Wells nach dem Prinzip

3. Eigene Ergebnisse und Diskussion

der limitierenden Verdünnung kloniert. Die Klonierung eines Wells ergab mittels ELISA 6 positive Klone. Ein positiver Klon wurde ein zweites Mal kloniert und es ergaben sich mit Hilfe des ELISAs 8 positive Klone. Zwei dieser Klone C5 und E3 wurden vervielfältigt, um den Antikörper in großen Mengen zu produzieren. Dabei war die Antikörperproduktion *in vitro* für beide Klone erfolgreich und die Isotypisierung ergab, dass es sich um IgG₁-Antikörper handelt. Mit Hilfe der Protein-G-Affinitätschromatographie konnten insgesamt 0,3 mg des Klons C5 aus 60 ml Hybridomüberstand und 1,6 mg des Klons E3 aus 220 ml Hybridomüberstand isoliert werden. Die Charakterisierung mittels SDS-PAGE zeigte, dass nach der Isolierung nur noch eine Bande (Klon E3) bzw. 2 Banden (Klon C5) im Bereich von 150 kDa zu erkennen waren. Beide Klone wurden im ELISA positiv auf die Reaktion mit rGel getestet, allerdings zeigt E3 im Vergleich zu C5 nur eine schwach positive Reaktion und hat somit eine geringere Affinität. Im Western-Blot konnte gezeigt werden, dass beide Klone sowohl rGel als auch nGel detektieren können. Abschließend wurde noch der Antikörpertiter und die Kreuzreaktivität mit anderen Proteinen bestimmt. Das Ergebnis der Antikörpertiterbestimmung bestätigte, dass der Klon C5 eine höhere Affinität besitzt als Klon E3. Er ist deshalb wahrscheinlich besser für die Charakterisierung des Konjugats geeignet. Beide Klone zeigen eine höhere Affinität zu rGel als zu nGel. Eine Kreuzreaktivität beider Klone mit den getesteten Proteinen wurde nicht nachgewiesen. Das Ziel der Herstellung eines monoklonalen anti-Gelonin-Antikörpers wurde also *in vitro* erreicht und er kann für die Charakterisierung eingesetzt werden. Die Antikörperproduktion *in vivo* war nicht erfolgreich, denn nach der Isolierung aus der Aszitesflüssigkeit wurden nur geringe Mengen des Antikörpers nachgewiesen. Ein Grund hierfür ist wahrscheinlich, dass die Mäuse auf Grund der Bildung von Tumoren zu früh getötet werden mussten und zu diesem Zeitpunkt noch nicht ausreichend Antikörper gebildet worden war. Da keine großen Mengen des anti-Gelonin-Antikörpers isoliert werden konnten, wurde die Herstellung einer Affinitätssäule zur Aufreinigung des Konjugats im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

4. Zusammenfassung

Zur Herstellung des Immunotoxins aus dem Ribosomen-inaktivierenden Protein Gelonin und dem anti-PD-1-Antikörper im Rahmen dieser Arbeit mussten zunächst die beiden Komponenten isoliert werden. Als Toxinkomponente wurde sowohl natürliches als auch rekombinantes Gelonin isoliert. Aus 23 mg Samen der Pflanze *Gelonium multiflorum* konnten insgesamt 29,8 mg nGel isoliert und für die Herstellung des Konjugats eingesetzt werden. Die Isolierung von rGel aus *E. coli* war ebenfalls erfolgreich, denn es wurden durchschnittlich 0,5-4 mg rGel aus 2 l Bakterienkultur isoliert und mittels SDS-PAGE, ELISA und Western-Blot nachgewiesen. Ein Teil von rGel konnte ohne weitere Aufarbeitung für die Herstellung des Konjugats eingesetzt werden und der andere Teil wurde für die Herstellung des anti-Gelonin-Antikörpers eingesetzt. Hierzu wurde vorher noch der His-Tag mit Hilfe von Thrombin abgespalten. Über eine SDS-PAGE wurde die Abspaltung nachgewiesen, denn auf dem Gel war ein geringer Massenverlust von ca. 1,5 kDa im Vergleich zu rGel auf dem Gel sichtbar. Der anti-PD-1-AK, wurde mittels Protein-G-Affinitätschromatographie isoliert. Es wurden 11,5 mg des Klons 1H10 aus dem Zellkulturüberstand und 16,9 mg des Klons 4F10 aus der Aszitesflüssigkeit isoliert. Mittels Durchflusszytometrie wurde bestätigt, dass beide Klone an PD-1 auf der Oberfläche von Zellen binden können und sie konnten ohne weitere Aufarbeitung für die Konjugatherstellung eingesetzt werden.

Die Kopplungsversuche erfolgten sowohl mit natürlichem Gelonin als auch mit rekombinantem Gelonin. Hierzu war zunächst die Einführung von Thiolgruppen in nGel, rGel und den anti-PD-1-AK durch Modifizierung mit 2-Iminoethanol notwendig. Nach zahlreichen Optimierungsversuchen war die Modifizierung erfolgreich und es konnte das thiolmodifizierte nGel oder rGel mit dem Spacer BMME modifiziert werden. Auch diese Modifizierung war nach der Optimierung der Reaktion erfolgreich. Die Kopplung der beiden modifizierten Proteine verlief ebenfalls erfolgreich, wie mittels SDS-PAGE nachgewiesen werden konnte, denn hier waren Banden bei 220 kDa (Klon J43) und 199 bzw. 200 kDa (Klon 4F10) sichtbar. Allerdings wurden auch Mehrfachkonjugate gebildet. Die Abtrennung der nicht umgesetzten Edukte mittels HPLC war nicht erfolgreich. Es konnte nur freies nGel oder rGel und dimeres nGel oder rGel aus der Reaktionslösung entfernt werden. Eine Trennung von Antikörper und Konjugat erfolgte auf Grund des geringen Massenunterschieds nicht. Des Weiteren stellte die starke Verdünnung durch die Chromatographie ein Problem dar. Denn es waren keine nachweisbaren Proteinmengen mehr vorhanden, mit denen weitergearbeitet werden konnte.

Deshalb wurde zunächst die Konjugatkonzentration durch den Einsatz von höheren Proteinmengen gesteigert, bevor alternative Aufreinigungsmethoden getestet wurden. Die Reaktion wurde hier nur noch mit rGel und dem anti-PD-1-AK (Klon 4F10) durchgeführt. Mittels SDS-PAGE konnte gezeigt werden, dass das Konjugat erfolgreich mit höherer Konzentration gebildet wurde. Mittels ÄKTA erfolgte die Abtrennung der nicht umgesetzten Edukte. Auch hier konnte nur freies rGel abgetrennt werden. Als weitere Alternative wurde die Trennung mit Hilfe der Nickelaffinitätschromatographie versucht. Hier eluierte nur ein kleiner Teil des Konjugats alleine in der Elutionsfraktion. Der größte Anteil des Konjugats wurde nicht vom Antikörper getrennt. Dennoch könnte mit der Optimierung dieser Methode in Zukunft eine Trennung möglich sein. Außerdem käme als weitere Trennungsmethode die Affinitätschromatographie mit dem anti-Gelonin-Antikörper in Frage. Da aber nicht ausreichend Antikörper mit einer hohen Affinität zur Verfügung stand konnte dies im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden.

Da die Trennung von Antikörper und Konjugat nicht erfolgreich verlief, musste die Charakterisierung mit dem Konjugatgemisch durchgeführt werden. Im ELISA und Western-Blot kam es zu Problemen, da der anti-PD-1-AK Kreuzreaktionen mit dem verwendeten Sekundärantikörper zeigte. Deshalb konnte die positive Reaktion nicht auf das Konjugat zurückgeführt werden. Um eine eindeutige Charakterisierung zu ermöglichen, sollte für zukünftige Arbeiten nach alternativen Sekundärantikörpern gesucht werden. Der größte Erfolg könnte jedoch durch eine vorherige Trennung von Konjugat und Antikörper erzielt werden.

Zur Bestimmung der Bindungsaffinität, der Mortalitätsrate und der Toxizität des Konjugats konnte ebenfalls nur das Konjugatgemisch eingesetzt werden. Bei der Bestimmung der Bindungsaffinität mittels Durchflusszytometrie wurde zwar nachgewiesen, dass der anti-PD-1-AK noch an PD-1 binden kann, allerdings blieb unklar, ob dies auf das Konjugat zurückzuführen ist oder auf den freien Antikörper. Beim Einsatz des anti-Gelonin-AK als Alternative war das Ergebnis eher als negativ zu betrachten und beim Einsatz von anti-His-IgG₁-AK war das Ergebnis im Vergleich zur Kontrolle nicht eindeutig. Allerdings war eine positive Tendenz zu erkennen und es wurde davon ausgegangen, dass das Konjugat an die Zellen binden kann. Für zukünftige Arbeiten sollte reines Konjugat eingesetzt und nach alternativen Antikörpern gesucht werden. Bei der Bestimmung der Mortalität konnte nur eine Mortalitätsrate von 10 % im Vergleich zur Kontrolle ermittelt werden. Es wurde also keine

signifikante Wirkung des Konjugats auf die Zellen nachgewiesen. Mittels des *in-vitro*-Translationsassays wurde für das Konjugatgemisch eine Toxizität von 607 ng/ml bestimmt. Die Toxizität (IC₅₀) verändert sich zwar im Vergleich zu rGel (2,7 ng/ml) sollte aber noch ausreichend sein um die Zellen abzutöten. Das bedeutet, dass die fehlende Wirkung des Konjugats *in vitro* vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass das Konjugat nicht in die Zellen gelangt. Der Grund hierfür könnte sein, dass die Bindung des Konjugats an PD-1 nicht wie erhofft zur Endozytose führt. Hierzu sollten bei zukünftigen Arbeiten Untersuchungen durchgeführt werden. Da keine Wirkung des Konjugats *in vitro* nachgewiesen werden konnte wurden die Untersuchungen zur Wirkung *in vivo* in einem Mausmodell für Hauttransplantationen nicht mehr durchgeführt.

Zur Herstellung des anti-Gelonin-Antikörpers für die bessere Charakterisierung und Aufreinigung des Konjugats wurden 4 BALB/c Mäuse erfolgreich immunisiert, deren Milzzellen präpariert und für die Fusion eingesetzt oder eingefroren. Es wurden 3 Fusionen durchgeführt von denen eine 5 eindeutig positive Klone lieferte. Nach 2fachem Klonieren und Vervielfältigen von 2 erhaltenen Klonen (E3 und C5) wurden mittels Protein-G-Affinitätschromatographie insgesamt 0,3 mg des Klons C5 aus 60 ml Hybridomüberstand und 1,6 mg des Klons E3 aus 220 ml Hybridomüberstand isoliert. Die Isotypisierung ergab, dass es sich um IgG₁-Antikörper handelt. Das Ergebnis wurde mittels ELISA und Western-Blot bestätigt und es konnte gezeigt werden, dass E3 im Vergleich zu C5 eine geringere Affinität besitzt. Beide Antikörper detektieren ebenfalls nGel. Die Bestimmung der Kreuzreaktivität war für beide Klone negativ. Sie reagieren nicht mit den anderen getesteten Proteinen. Die Antikörpertiterbestimmung bestätigte noch einmal, dass C5 eine höhere Affinität besitzt als E3. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Antikörperproduktion *in vitro* erfolgreich war. Die Antikörperproduktion *in vivo* war nicht erfolgreich, da nur sehr geringe Mengen Antikörper aus der Aszitesflüssigkeit isoliert werden konnten. Die Ursache hierfür ist wahrscheinlich, dass die Mäuse auf Grund der Bildung von Tumoren zu früh getötet werden mussten und zu diesem Zeitpunkt noch nicht ausreichend Antikörper gebildet worden war. Der Versuch konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht wiederholt werden.

5. Experimenteller Teil

5.1 Materialien

5.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

ÄKTA:	GE Healthcare ÄKTA purifier 10
Autoklav:	Sitram Dampfkochtopf; Systec V65
Brutschrank:	New Brunswick scientific Innova CO-170; Brutschrank Memmert
β-Counter:	Packard Tri-Carb Liquid Scintillation Analyzer 2200CA
Densitometer:	Hirschmann Elscript 400
Durchflussphotometer:	LKB Bromma 2138 Uvicord S
Elektrophoresezubehör:	BIO-RAD; Lichtbank; Canon Powershot G10
FACS:	Beckton Dickinson FACS sort
Fraktionssammler:	LKB Bromma 2111 Multirac
HPLC:	Beckman HPLC System Gold; 125 Solvent Module; 168 Detector
Inkubatoren:	Luftschüttler New Brunswick Incubator Shaker Innova 4000; Wasserschüttler Infors AG HTBTR 112; MaxQ von Thermo Scientific
Konzentratoren:	Sartorius Biolab Products VIVASPIN 6 und VIVASPIN 20 (10000 MWCO PES)
Küvetten:	Brand Plastibrand Einmalküvetten; Hellma Präzisionsküvetten aus Quarzglas Suprasil
Magnetrührer:	Janke & Kunkel IKA-Werk KMO 2 electronic
Mikroskop:	VWR InWert IT 400 Trino Plan
Mikrowelle:	Privileg M 401
Mixer:	Waring Blendor Typ 8011

5. Experimenteller Teil

pH-Meter:	WTW pH 521
Pipetten:	Brand Transferpette S 10 µl; Accujet pro; Flow Titertek 300 µl Digital multichannel Pipette; Eppendorf 20 µl, 200 µl, 1000 µl; Multipette plus 1000 µl
Plattenreader:	BIO-RAD Typ 2550; Epoch BioTek
Pumpe:	Peristaltikpumpe LKB Bromma 2120 Varioperpex; Pharmacia Biotech Pump P1
Rotationsverdampfer:	Büchi Rotavapor RE 120
Rotoren:	Beckman Type Ti70, JA10, JA20
Schreiber:	LKB Bromma 2210 2-Channel Recorder; BBC Goerz metrawatt SE120
Schüttler:	VWR Rocking Platform; Stuart Rotator SB3
Spannungsgeräte:	BIO-RAD Power Pac 3000; VWR Power Source 300 V
Sterilbank:	Heraeus Instruments LaminAir HLB 2448
Thermomixer:	Eppendorf Thermomixer comfort
Trockenschrank:	Heraeus T 5050
Ultraschall:	Branson Sonifier B-12
UV/VIS-Spektrophotometer:	Eppendorf BioPhotometer plus; Thermo Scientific Genesys 10UV scanning; Thermo Scientific Nano Drop 2000c
Vortex:	Heidolph Reax 1 D; Janke & Kunkel IKA-Labortechnik VF2
Waagen:	Feinwaage Mettler Toledo excellence; Sartorius L610 D
Wasserbad:	Julabo VC
Zentrifugen:	Beckman Optima LE-80k Ultrazentrifuge, J2-21; Eppendorf Zentrifuge 5415C, 5415R, 5810R; Heraeus Minifuge T, Labofuge A

5.1.2 Chemikalien

Substanz	Firma
Aceton	Fisher Chemicals
Acrylamid Rotiphorese Gel 30	Roth
Ammoniumpersulfat	Sigma
BCA Protein Assay Reagenz A und B	Uptima
BCIP/NBT premixed Solution	Sigma
Bis-(maleimido)-methylether	Uptima
Bromphenolblau	Serva
Calciumchlorid	Roth
Creatinphosphat	Serva
Creatinphosphokinase	Sigma
Diethanolamin	Merck
Dimethyldichlorsilan-Lösung (5 %)	Sigma
Dimethylformamid	Acros
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck
4,4'-Dithiodipyridin	Sigma
Dithiotreitol	AppliChem
EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat	Merck
Essigsäure	Riedel-de Haën
Ethanol	Roth
Freund`s Adjuvant (<i>complete</i>)	Sigma
Freund`s Adjuvant (<i>incomplete</i>)	Sigma
Glycerin	Roth
Glycin	MP Biomedicals
Hämin	Serva
Imidazol	Roth
2-Iminothiolan	Sigma
Instant Blue™	Expedeon
IPTG	AppliChem
Kaliumchlorid	Merck
Kanamycin-Sulfat	Fluka

5. Experimenteller Teil

LB-Medium (Luria, Miller)	Roth
Magnesiumchlorid	Merck
2-Mercaptoethylamin	Merck
Methanol	J.T. Baker
Milchpulver	AppliChem
Natriumazid	Sigma
Natriumchlorid	Roth
Natriumdesoxycholat	Sigma
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Natriumhydrogencarbonat	Riedel-de Haën
Natriumhydroxid	J. T. Baker
Nickelsulfat	Sigma
4-Nitrophenylphosphat	Boehringer Mannheim
Page Blue™	MBI Fermentas
Pentan	Fisher Scientific
Polyethylenglykol	Merck
Ponceau S	AppliChem
Propidiumiodid	Sigma
Proteaseinhibitor-Tabletten	Roche
Pristan	Sigma
Retikulozyten-Lysat	Invitrogen
Rotiszint ecoplus	Roth
Salzsäure	J. T. Baker
SDS	Roth
Streptavidin-Peroxidase	Sigma
TEMED	AppliChem
Trichloressigsäure	Riedel-de Haën
Triethanolamin	Fluka
Tris	AppliChem
Tween 20	Sigma
L-Valin	Sigma
L-[U- ¹⁴ C]Valin	Hartmann Analytic

5.1.3 Zellkulturmaterialien, Medien und Reagenzien

5.1.3.1 Medien und Reagenzien

<u>Medium, Reagenz</u>	<u>Firma</u>
DMSO	Appli Chem
FKS	PAA
Gentamycin	Gibco
HAT-Zusatz	Invitrogen
HEPES	Gibco
HT-Zusatz	Invitrogen
Hybridoma Cloning Supplement	PAA
L-Glutamin	PAA
Natriumpyruvat	PAA
Non essential aminoacids 100 x	Gibco
Opti-MEM	Invitrogen
PBS	PAA
Penicillin/Streptomycin	PAA
RPMI 1640	PAA
Trypanblau	Sigma

5.1.3.2 Materialien

<u>Material</u>	<u>Firma</u>
C-Chip Disposable Hemocytometer	PAA
Einwegpipetten (5 ml, 10 ml)	Greiner Bio One
Kryoröhrchen	Greiner Bio One
Mikrotiterplatten (96-, 24-, 6-Well)	Greiner Bio One
Pipettenspitzen (blau und gelb)	Greiner Bio One, Sarstedt
Sterilfilter (0,45 µm, 0,22 µm)	Sartorius
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ² , 125 cm ²)	Greiner Bio One
Zellkulturschalen (94 mm, 145 mm)	Greiner Bio One

5.1.4 Proteinmarker

Marker	Firma
Protein Marker III (6,5-200 kDa)	Appli Chem

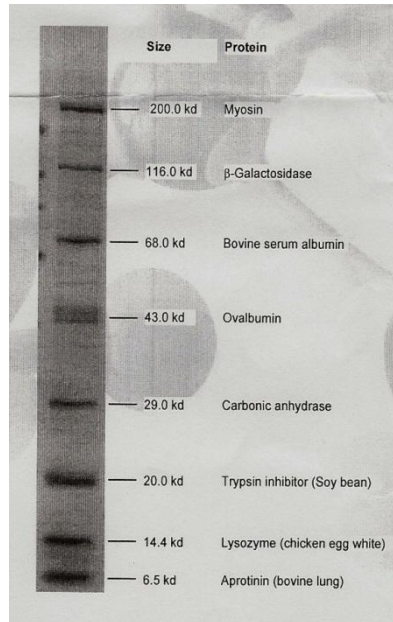


Abbildung 5.1: Referenzbanden des verwendeten Proteinmarkers (Appli Chem Homepage)

5.1.5 Säulen und Säulenmaterialien

Säule	Firma
Fractogel TSK CM 650 S 1	Serva
HiTrap Chelating	GE Healthcare
Protein G-Säule	GE Healthcare
Sephadex G-25	Sigma Aldrich
Superdex 200 10/300 GL	GE Healthcare (AG Herrmann, TU KL)
Superdex 75 10/300 GL	GE Healthcare (AG Keller, TU KL)
Zorbax Bio Series GF-250	Agilent Technologies

5.1.6 *E. coli*-Stämme und Plasmide

Stamm	Genotyp
BL21(DE3)	F^- , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> (r_B^- , m_B^+), <i>gal</i> , <i>dcm</i> (DE3)

Der Genotyp wurde nach Sambrook *et al.* (Sambrook *et al.*, 1989) bestimmt.

Plasmid	Größe	Resistenz	Quelle
pET-gel	6089 bp	Kanamycin	(Li, 2002)

Die Plasmide pIB30 und pI106 wurden von Dr. Rodriguez-Barbosa (IBIOMED, León) zur Verfügung gestellt.

5.1.7 Proteine und Enzyme

Protein	Firma
Aprotinin	Roth
Chymotrypsin	Appli Chem
Creatinphosphokinase	Sigma
Cytochrom c	Sigma
β -Galactosidase	Sigma
Lysozym	Boehringer Mannheim
Rinderserumalbumin (BSA)	Roche
Thrombin (1,2 U/ μ l)	Novagen

5.1.8 Zelllinien

Zelllinie	Firma
X63Ag8.653	Cell line service (CLS)
HEK293T	Dr. Rodriguez-Barbosa, IBIOMED, León

5.1.9 Antikörper

<u>Antikörper</u>	<u>Firma</u>
mouse-anti-polyHistidin	Sigma (Prod.-Nr. H 1029)
anti-mouse IgG (F _c -specific)-AP	Sigma (Prod.-Nr. A 2429)
anti-mouse IgM (μ-chain specific)-AP	Sigma (Prod.-Nr. A 9688)
rat-anti-PD-1 clone 4F10	Dr. Rodriguez-Barbosa, IBIOMED, León
hamster-anti-PD-1 clone J43	Dr. Rodriguez-Barbosa, IBIOMED, León
rat-anti-PD-1 clone 1H10	Dr. Rodriguez-Barbosa, IBIOMED, León
anti-rat-IgG _{2a} -Biotin	Dr. Rodriguez-Barbosa, IBIOMED, León
anti-mouse-IgG ₁ -Biotin	Dr. Rodriguez-Barbosa, IBIOMED, León
mouse-anti-His-IgG ₁	Dr. Rodriguez-Barbosa, IBIOMED, León

5.1.10 Puffer und Lösungen

Die Puffer und Lösungen werden, falls nicht anders angegeben, ausschließlich mit bidestilliertem Wasser hergestellt. Zum Einstellen des pH-Wertes wird NaOH oder HCl verwendet.

5.1.11 Sonstige Materialien

<u>Kit</u>	<u>Firma</u>
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
Endo Free Plasmid Maxi Kit	Qiagen

5.2 Allgemeine Arbeitsmethoden

5.2.1 Konzentrationsbestimmungen

5.2.1.1 UV-Vis-Spektroskopie

Auf Grund der aromatischen Aminosäuren Tyrosin (Tyr), Tryptophan (Trp) und Phenylalanin (Phe), absorbieren Proteine Licht im Bereich von 280 nm. Somit lässt sich die Konzentration von reinen Proteinlösungen mittels der UV-Vis-Spektroskopie photometrisch bestimmen (Peterson, 1977). Als Grundlage dieser Messungen dient das Lambert-Beersche Gesetz. Mit Hilfe dieses Gesetzes kann, bei bekanntem molarem Extinktionskoeffizienten, die Konzentration berechnet werden (Peterson, 1983; Layne, 1957). In Tabelle 5.1 sind die molaren Extinktionskoeffizienten der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Proteine aufgeführt.

Das Lambert-Beersche-Gesetz:

$$E = c \cdot d \cdot \varepsilon$$

mit E: Extinktion [dimensionslos]

c: molare Konzentration [mol/l]

d: Länge [cm]

ε : molarer Extinktionskoeffizient [$M^{-1} \cdot cm^{-1}$]

Tabelle 5.1: Molare Extinktionskoeffizienten der verwendeten Proteine und Substanzen

Protein	Molarer Extinktionskoeffizient ε_{280nm} [$M^{-1} \cdot cm^{-1}$]	E_{280nm} für 1 mg/ml
BSA ¹	45400	0,67
Gelonin ¹	20100	0,67
IgG ²	202500	1,35
4-Thiopyridon ³	19800	-

¹(Kreilinger, 2001), ²(GE Healthcare Katalog, 2009), ³(Schäfer, 1990)

5.2.1.2 BCA-Test

Der BCA-Test ist eine Methode zur Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen (Testkit Fa. Uptima). Die Konzentrationen werden in Bezug auf Standardproteine (z. B. BSA) mit bekannten Konzentrationen über eine Eichgerade ermittelt. Die mitgelieferten Reagenzien ergeben ein Gemisch aus 4,4'-Dicarboxy-2,2'-bichinolinnatriumsalz (BCA, Reagenz A) und Kupfer-(II)-sulfat (Reagenz B). Bei der Farbreaktion werden die Cu^{2+} -Ionen aus der Kupfer-sulfatlösung durch die oxidierbaren Aminosäuren Cystein, Tryptophan und Tyrosin im Protein zu Cu^+ -Ionen reduziert und dann von 2 Molekülen BCA komplexiert. Die nun blauviolette Lösung wird bei 562 nm photometrisch bestimmt (Smith *et al.*, 1985). Die Durchführung erfolgt nach dem biochemischen Praktikumsskript (Trommer, 2009).

5.2.1.3 Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA Lösungen

Die Konzentration von wässrigen Plasmid-DNA Lösungen wird bei 260 nm photometrisch bestimmt, da die DNA hier ein Absorptionsmaximum besitzt. Dabei gilt folgende Beziehung:

$$1 \text{ OD}_{260} \cong 50 \text{ } \mu\text{g/ml dsDNA}$$

Die Lösungen werden in Quarzküvetten vermessen und die Konzentration nach der obigen Beziehung berechnet (Sambrook *et al.*, 2001).

5.2.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ist eine Methode zur Auftrennung und Charakterisierung von Proteinen aufgrund ihres Molekulargewichts, sowie zur Bestimmung ihrer Reinheit. Die Größenauftrennung beruht auf der Umwandlung der Proteine in Polyanionen und deren Denaturierung durch Bindung des Detergens SDS. Die negativ geladenen Proteine wandern dann im elektrischen Feld zur Anode und werden so entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Hierbei wird der Siebeffekt des Gels ausgenutzt: kleinere Moleküle wandern schneller durch die Poren des Gels, während größere länger zurückgehalten werden. Die Methode der SDS-PAGE ist bis auf wenige Abweichungen auf Laemmli (Laemmli, 1970) zurückzuführen. Die Durchführung erfolgt nach dem biochemischen Praktikumsskript (Trommer, 2009; Smith, 1984). Die Abweichungen zum Praktikumsskript und die Herstellung der verwendeten Gele sind im Folgenden aufgeführt:

Benötigte Lösungen:

Elektrophoresepuffer (10x):	1,9 M Glycin 0,25 M Tris 1 % SDS pH 8,3 (Kontrolle)
Elektrophoresepuffer (1x):	100 ml Elektrophoresepuffer (10x) ad 900 ml Wasser
Probenpuffer:	0,18 M Tris 40 % Glycerin 4 % SDS 0,2 M DTT pH 6,8 0,04 % Bromphenolblau
nicht reduzierender Probenpuffer:	siehe Probenpuffer ohne DTT

Tabelle 5.2: Pipettierschema für gängige Trenn- und Sammelgele (Schanz, 2009)

	Trenngel 7%ig	Trenngel 12%ig	Sammelgel 4,5%ig
Acrylamidlösung	2,8 ml	4,8 ml	0,6 ml
Wasser	6,1 ml	4,1 ml	2,4 ml
Trenngelpuffer (4x)	3 ml	3 ml	-
Sammelgelpuffer (4x)	-	-	1 ml
APS-Lösung	60 µl	60 µl	24 µl
TEMED	24 µl	24 µl	8 µl

Durchführung:

Die Proben werden mit der entsprechenden Menge Probenpuffer versetzt und 10 min bei 95 °C denaturiert. Anschließend werden sie auf das Gel aufgetragen und die Elektrophorese gestartet. Die Spannung wird, während die Proben durch das Sammelgel wandern, auf 75 V eingestellt und dann auf 125 V erhöht.

5.2.2.1 Coomassie-Färbung des Gels

Die Gele werden entweder mit *PageBlue*TM Protein Staining Solution (Fa. Fermentas) oder Instant BlueTM (Fa. Expedeon) gefärbt. Beide Lösungen enthalten den Farbstoff Coomassie Brilliantblau, der sich an positiv geladene Seitenketten der Proteine anlagert. Die Durchführung erfolgt nach der Anleitung der Herstellerfirmen.

5.2.2.2 Molekulargewichtsbestimmung

Durch Vergleich mit bekannten Molekulargewichten von Standardproteinen lässt sich das Molekulargewicht der Proteine auf dem SDS-Gel bestimmen. Hierzu wird eine Eichgerade erstellt, indem der Logarithmus der Molekulargewichte der Standards gegen die Laufstrecke im Gel aufgetragen wird. Aus der Regressionsgeraden wird das gesuchte Molekulargewicht berechnet.

5.2.3 Dialyse

Die Dialyse ist eine Methode zum Wechseln des Puffersystems von Proteinlösungen und zur Entfernung von niedermolekularen Substanzen. Hierbei fungiert der Dialyseschlauch als semipermeable Membran, die kleine und große Moleküle trennen kann. Die kleinen Moleküle wandern durch Osmose entlang eines Konzentrationsgefälles aus dem Schlauch, solange bis sich ein Gleichgewicht zwischen den Konzentrationen eingestellt hat. Die Moleküle, die größer sind als der Porendurchmesser, werden im Schlauch zurückgehalten (Stryer *et al.*, 2007).

Durchführung:

Ein Dialyseschlauch (Visking, T 27/32, Fa. Roth) wird 10 min in Wasser inkubiert, dann an einem Ende mit Hilfe von 2 Klammern verschlossen und die Proteinlösung eingefüllt. Das andere Ende wird nun auch mit 2 Klammern verschlossen und der Schlauch in 5 l Dialysepuffer (Zusammensetzung unterscheidet sich je nach Experiment) gelegt. Es erfolgt eine Inkubation über Nacht unter leichtem Rühren des Puffers. Am nächsten Tag wird der Dialysepuffer 2-mal gewechselt und jeweils 2 h inkubiert. Die Proteinlösung wird aus dem Schlauch entfernt und bei -20 °C gelagert.

5.2.4 Proteinkonzentration

5.2.4.1 Aufkonzentration mit Konzentratoren

Zur Aufkonzentration von Proteinlösungen werden Konzentratoren, die eine Membran mit definierter Porengröße besitzen, eingesetzt. Bei Zentrifugation (5000 x g, 4 °C, ca. 1 ml/min) treten kleine Moleküle durch die Membran und große Moleküle, die einen größeren Durchmesser als die Pore besitzen, werden zurückgehalten und dadurch aufkonzentriert.

5.2.4.2 TCA-Fällung

Diese Methode ermöglicht eine schnelle Aufkonzentration von Proteinen durch die Fällung mit Trichloressigsäure (TCA). Sie wird hauptsächlich zum Aufkonzentrieren der Proben für die SDS-PAGE verwendet. Nachteilig ist, dass die Proteine irreversibel denaturiert werden (Bensadoun und Weinstein, 1976).

Benötigte Lösungen:

DOC-Lösung:	15 % Natriumdesoxycholat
TCA-Lösung:	72 % Trichloressigsäure
Tris-Lösung:	2 M Tris

Durchführung:

500 µl der zu fällenden Proteinprobe werden mit 50 µl (10 % des Probenvolumens) DOC-Lösung versetzt, kurz aufgewirbelt und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend werden 50 µl (10 % des Probenvolumens) 72%ige TCA-Lösung zugegeben und es wird erneut gemischt. Nach 10 min auf Eis erfolgt eine Zentrifugation (20 min, 16000 x g). Der Überstand wird verworfen und das Pellet mit 200 µl eiskaltem Ethanol gewaschen, erneut für 20 min bei 16000 x g zentrifugiert und anschließend in 20 µl SDS-PAGE-Probenpuffer (siehe Kap. 5.2.2) aufgenommen. Durch Zugabe von 20 µl Tris-Lösung wird ein neutraler pH-Wert eingestellt. Daraus resultiert ein Farbumschlag von Gelb nach Blau. Nun kann nach der Anleitung für SDS-PAGE (siehe Kap. 5.2.2) weiter verfahren werden.

5.2.5 Silanisierung von Glasgefäßen

Zum Beispiel zur Vermeidung von Proteinverlusten können Glasgefäße silanisiert werden. Dazu werden die mit 70%igem Ethanol gereinigten Gefäße mit Silanisierungslösung (Dimethyldichlorsilan-Lösung 5 %, gebrauchsfertig, Fa. Sigma) befüllt und geschwenkt. Nach Abdampfen der Lösung werden die Gefäße noch einmal mit 70%igem Ethanol gespült und getrocknet.

5.2.6 Chromatographische Methoden

5.2.6.1 Affinitätschromatographie

Bei dieser Methode wird die hohe Affinität vieler Proteine zu bestimmten chemischen Gruppen, z. B. Metallionen, ausgenutzt, um Proteine aus einem Proteingemisch zu isolieren. Die Gruppen, die spezifisch mit dem Protein wechselwirken, werden kovalent an das Trägermaterial der Säule gebunden. Somit kann ein Protein an die Säule binden und durch Herabsetzen der Bindungsaffinität bzw. durch niedermolekulare Liganden wieder eluiert werden (Stryer *et al.*, 2007). Wichtige Anwendungsbereiche dieser Chromatographiemethode sind z. B. die Nickelaffinitätschromatographie, bei der rekombinante Proteine über einen inklonierten Affinitätsanker (z. B. His-Tag) an eine Nickelionen chelatisierende Säule binden und mit einer hohen Konzentration Imidazol eluiert werden, oder die Protein-G-Affinitätschromatographie zur Isolierung von Antikörpern.

5.2.6.2 Ionenaustauschchromatographie

Das Prinzip eines Ionenaustauschers besteht darin, Proteine hinsichtlich ihrer Nettoladung zu trennen. Ein positiv geladenes Protein kann an eine Säule mit negativ geladenen Gruppen (Carboxylgruppen) binden, wohingegen negative Proteine keine Bindung eingehen. Die Elution des gebundenen Proteins erfolgt durch die Erhöhung der Salzkonzentration (z. B. NaCl) im Elutionspuffer, da die Salzionen mit den positiv geladenen Gruppen um die Bindungsstellen konkurrieren. Zuerst werden Proteine mit geringer Ladungsdichte eluiert und später die Proteine mit hoher Ladungsdichte (Stryer *et al.*, 2007). Diese Methode findet Anwendung bei der Isolierung von Gelonin aus den Samen von *Gelonium multiflorum* (siehe Kap. 5.5.1). Hierbei wird eine Kationenaustauschsäule verwendet.

5.2.6.3 Gelfiltrationschromatographie

Die Gelfiltrationschromatographie ist eine Methode, bei der Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Hierbei werden Säulenmaterialien eingesetzt, die aus porösen Kügelchen mit definierter Porengröße bestehen. Kleinere Moleküle können in die Poren eindringen und werden dadurch verzögert, während große Moleküle nicht in die Poren eindringen können und schneller durch die Säule wandern (Clark und Pazdernik, 2009). Wichtig für eine gute Auftrennung sind das Material, die Länge der Säule und das Molekulargewicht der zu trennenden Proteine, das sich um mindestens 25 % unterscheiden sollte.

5.2.6.4 HPLC

Die Hochdruck- oder Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC, *engl.: high pressure/performance liquid chromatography*) dient zur Trennung von Proteingemischen über spezielle Trennsäulen. Hierbei wird die Probe in einer mobilen Phase gelöst, mit hohem Druck über die Säule (stationäre Phase) gepumpt und auf Grund der jeweiligen Eigenschaften des Säulenmaterials aufgetrennt. Die einzelnen Fraktionen werden photometrisch detektiert und aufgesammelt. Diese Chromatographiemethode ermöglicht ein besseres Auflösungsvermögen als andere, da die Materialien für die Säulenmatrix feiner strukturiert sind und mehr Möglichkeit zur Interaktion besteht. Außerdem ist durch die Anwendung von hohem Druck eine schnellere Auftrennung möglich (Clark und Pazdernik, 2009; Stryer *et al.*, 2007).

5.2.6.5 ÄKTA

Als Nachfolgesystem der FPLC (*engl.: fast protein liquid chromatography*) dient die ÄKTA (*schwed.: echt*) zur Proteinaufreinigung. Hierbei wird die Auftrennung von Proteingemischen durch spezifische Trennsäulen ermöglicht. Es stehen viele unterschiedliche Materialien zur Verfügung. Das Proteingemisch bildet mit dem Puffer eine mobile Phase und wird mittels eines Pumpensystems über die Säule (stationäre Phase) gepumpt, somit wird eine schnelle Trennung gewährleistet. Die Fraktionen werden photometrisch detektiert, gesammelt und mit Hilfe des Chromatogramms identifiziert (GE Healthcare, 2012).

5.3 Zellbiologische Arbeitsmethoden

Bei allen Arbeiten in der Zellkultur muss auf Sterilität geachtet werden, deshalb finden die Arbeitsschritte in der Sterilbank statt und die Medien, Reagenzien und das Arbeitsmaterial sind steril verpackt oder werden autoklaviert. Alle nicht autoklavierbaren Materialien und Oberflächen werden vor Gebrauch mit Softaman oder 70%igem Ethanol abgewischt. Die verwendeten Medien und Reagenzien sollten vor Gebrauch auf 37 °C vorgewärmt werden.

5.3.1 Hitzeinaktivierung von fetalem Kälberserum

Das Serum wird über Nacht bei 4 °C aufgetaut und am nächsten Tag 30 min bei 56 °C inkubiert. Anschließend wird es aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

5.3.2 Einfrieren und Lagern von Zellen

Es werden Zellaliquots mit einem Volumen von 1 ml oder 1,5 ml gelagert. Hierzu wird eine Zelldichte von mindestens 1×10^6 Zellen/ml in 700 µl bzw. 1050 µl des entsprechenden Kulturmediums eingestellt und es werden 20 % FKS und 10 % DMSO tropfenweise hinzugegeben. Nach dem Invertieren der Röhrchen werden diese bei -80 °C gelagert. Für längerfristige Lagerung sollten Aliquots in flüssigem Stickstoff gelagert werden.

5.3.3 Auftauen von Zellen

Die Zellen werden bei 37 °C aufgetaut, mit 5 ml Medium versetzt und in der Heraeus Labofuge A zentrifugiert (2000 rpm, 5 min), um das DMSO zu entfernen. Anschließend wird das Zellpellet im entsprechenden vorgewärmten Kulturmedium resuspendiert und in das jeweilige Kulturgefäß überführt.

5.3.4 Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer

Zur Bestimmung der Zellzahl wird eine Neubauer-improved-Zählkammer verwendet. Die Zellen werden im Verhältnis 1:1 mit dem Farbstoff Trypanblau, der nur in tote Zellen

eindringen kann und diese blau färbt, gemischt und in die Zählkammer eingespritzt. Die Zellzahl wird nach der folgenden Formel berechnet:

$$Z = \frac{\sum Z_{\text{leb}}}{n} \cdot V \cdot NV$$

mit Z: Zellzahl pro ml Zellsuspension

Z_{leb} : Anzahl lebender Zellen pro Quadrat

n: Anzahl ausgezählter Quadrate

V: Verdünnungsfaktor

NV: Neubauerfaktor (=10000)

(Volumenfaktor)

5.3.5 Kultivierung und Abernten von Zellen

5.3.5.1 Kultivierung und Abernten von adhärennten Zellkulturen

Die für die Untersuchungen von Bindungsaffinität und Wirkung des Konjugats benötigte adhärennt wachsende Zelllinie HEK293T wird bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert.

Benötigte Lösungen:

Kulturmedium:	RPMI 1640
	10 % FKS
	10 mM HEPES
	2 mM L-Glutamin
	50 µg/ml Gentamycin
	1 mM Non essential aminoacids 100 x

Durchführung:

Die Zellen werden in 94-mm-Schalen mit 20 ml Medium oder 145-mm-Schalen mit 50 ml Medium kultiviert. Nach ca. 2 Tagen sollte das Medium der Zellen erneuert werden. Zum Abernten der Zellen wird das Medium vorsichtig abgesaugt, die Zellen anschließend mit 10 ml bzw. 20 ml frischem Medium versetzt und durch Auf- und Abpipettieren vom Boden gelöst. Danach werden 3 Tropfen bzw. 4 Tropfen der Suspension in 20 ml bzw. 50 ml neues Medium gegeben und im Brutschrank inkubiert.

5.3.5.2 Kultivierung und Abernten von Suspensionskulturen

Die zur Herstellung des monoklonalen Antikörpers benötigte Suspensionskultur-Zelllinie X63Ag8.653 wird bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert.

Benötigte Lösungen:

Die Lösungen sind in Kap. 5.5.6.4 beschrieben.

Durchführung:

Die Zellen werden in 75-cm²-Flaschen mit 40 ml Medium oder 125-cm²-Flaschen mit 150 ml Medium inkubiert. Nach einer Woche wird das verbrauchte Medium gewechselt. Hierbei werden 5 ml bzw. 20 ml der Zellsuspension in 40 ml bzw. 150 ml frisches Medium gegeben. Zum Abernten werden die Zellen in der Heraeus Labofuge A zentrifugiert (2000 rpm, 5 min) und für die Fusion (siehe Kap. 5.5.6.4) eingesetzt.

5.3.6 Transfektion

Die Transfektion ist eine Methode zum Einbringen von Fremd-DNA in eukaryontische Zellen (Alberts *et al.*, 2004).

Durchführung:

Die Zellen (HEK 293T) werden wie in Kapitel 5.3.5.1 beschrieben kultiviert. Am Tag der Transfektion wird das Medium abgesaugt, durch frisches Medium ohne FKS ersetzt und die Zellen für 15 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. In der Zwischenzeit wird das Transfektionsmedium für eine Platte vorbereitet, indem zuerst 1800 µl Opti-MEM mit 30 µg Plasmid DNA versetzt und gemischt werden. Anschließend werden noch 90 µl Liposomen zugetropft und vorsichtig vermischt. Nach einer 15-minütigen Inkubation des Transfektionsmediums bei 37 °C wird von den Zellen das Medium abgesaugt und durch das Transfektionsmedium mit 6 ml Opti-MEM ersetzt. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂. Am nächsten Tag wird das Transfektionsmedium durch Kulturmedium ersetzt und mittels Durchflusszytometrie (siehe Kap. 5.4.3) wird kontrolliert, ob die Transformation erfolgreich war.

5.4 Immunologische Arbeitsmethoden

5.4.1 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) ist ein häufig angewandter immunologischer Test zur qualitativen oder quantitativen Bestimmung von Antikörpern bzw. Antigenen. Diese Methode basiert auf der Adsorption von Proteinen (Antigenen) an Kunststoffoberflächen wie z. B. Polystyrol. Beim indirekten ELISA bindet ein spezifischer Primärantikörper an die Antigene und kann mit Hilfe eines Sekundärantikörpers, der an ein bestimmtes Enzym (alkalische Phosphatase) gekoppelt ist, detektiert werden. Das Enzym reagiert mit dem Substrat und es entsteht ein gelblicher Farbstoff, der monochromatisches Licht der Wellenlänge 414 nm absorbiert (Harlow und Layne, 1988; Peters und Baumgarten, 1990). Die bei dieser Methode eingesetzten Antikörper sind in Kap. 5.1.9 aufgeführt. Die Durchführung erfolgte nach dem biochemischen Praktikumsskript (Trommer, 2009).

5.4.2 Western-Blot

Der Western-Blot ist ein spezifisches Nachweisverfahren für einzelne Proteine, die zuvor mittels SDS-PAGE nach ihrer Größe aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert werden. Im Anschluss können die Proteine beim indirekten Western Blot mit Hilfe von zwei Antikörpern detektiert werden. Hierbei bindet der Primärantikörper das entsprechende Protein und der Sekundärantikörper, der an ein Enzym gekoppelt ist, dient der Detektion des Primärantikörpers. Als Enzym wird hier alkalische Phosphatase eingesetzt, die bei Zugabe eines löslichen Substrats dieses in einen Farbstoff umwandelt (Clark und Pazdernik, 2009). Die Durchführung erfolgte nach Schanz (Schanz, 2009). Die eingesetzten Antikörper sind in Kap. 5.1.9 aufgeführt.

Benötigte Lösungen:

Anodenpuffer A:	300 mM Tris
	20 % Methanol
	pH 11,3

5. Experimenteller Teil

Anodenpuffer B:	25 mM Tris 20 % Methanol pH 10,6
Kathodenpuffer:	25 mM Tris 20 % Methanol 40 mM Glycin 0,005 % SDS pH 9,4
Ponceau-S-Lösung:	0,25 % Ponceau S 40 % Methanol 15 % Eisessig filtrieren
TBS (10x):	0,1 M Tris 1,5 M NaCl pH 7,4
TBS-Tween:	1x TBS 0,1 % Tween-20
Blockierlösung:	5 % Magermilchpulver in TBS-Tween
Substratlösung:	BCIP/NBT premixed solution (Sigma)

Durchführung:

Nach Beenden der Elektrophorese (siehe Kap. 5.2.2) wird das Gel 10 min in Kathodenpuffer inkubiert und gleichzeitig auch die Nitrozellulosemembran in Anodenpuffer B aktiviert. Im Anschluss werden die einzelnen Komponenten für den Blot in folgender Reihenfolge von unten nach oben auf die Kathode geschichtet: 1) ein in Anodenpuffer A eingelegtes Whatman-Papier, 2) ein in Anodenpuffer B inkubiertes Whatman-Papier, 3) die aktivierte Nitrozellulosemembran, 4) das in Kathodenpuffer inkubierte Gel und 5) zwei in Kathodenpuffer eingelegte Whatman-Papiere. Das Sandwich wird von Luftblasen befreit, die Anode darauf

gelegt und mit 1 kg Gewicht beschwert. Der Transfer erfolgt 80 min lang bei einer Stromstärke von 59 mA. Die Membran wird zur Kontrolle des Proteintransfers 5 min mit Ponceau-S-Lösung gefärbt und mit Wasser und TBS-Tween wieder entfärbt. Zur Blockade der unspezifischen Bindungsstellen wird die Membran 1 h bei RT in Blockierlösung gelegt, bevor diese über Nacht bei 4 °C mit dem Primärantikörper (Verdünnung 1:500 oder 1:1000 in Blockierlösung) inkubiert wird. Nach 3-mal Waschen für je 15 min mit TBS-Tween wird die Membran für 1 h bei RT in Sekundärantikörperlösung (Verdünnung 1:1000 in Blockierlösung) gegeben und anschließend 3-mal für je 15 min mit TBS-Tween gewaschen. Es erfolgt die Entwicklung der Farbreaktion mit BCIP/NBT in 2-5 min und die Membran wird noch 2-mal mit Wasser gespült.

5.4.3 Fluorescence-activated cell sorting (FACS) und Durchflusszytometrie

Die fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (*engl.: fluorescence-activated cell sorting*, FACS) ist eine Methode zur Auftrennung von Zellgemischen aufgrund ihrer Oberflächenantigene. Hierbei erfolgt zunächst eine Markierung der Zellsuspension mit monoklonalen Antikörpern, die sich gegen die Antigene richten und mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind. Die markierte Suspension wird elektrisch aufgeladen, tröpfchenweise in den Probenraum gesprüht, von einem Laser angeregt und das Fluoreszenzlicht wird detektiert. Auf Grund der Farbe der gemessenen Fluoreszenz werden die Zellen in die entsprechenden Sammelgefäße abgelenkt. Zellen, die kein Antigen enthalten, werden nicht gesammelt (Clark und Pazdernik, 2009). Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um ein FACS-ähnliches Verfahren. Hier werden die Zellen auch durch mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten monoklonalen Antikörpern gegen Oberflächenantigene der Zellen markiert. Die Zellen werden elektrisch geladen, in kleine Tröpfchen getrennt und aufgrund ihrer Fluoreszenz nachgewiesen. Allerdings werden die Zellen nicht getrennt und gesammelt, sondern die Fluoreszenzsignale werden graphisch dargestellt (Clark und Pazdernik, 2009).

Durchführung:

Die nicht transfizierten und mit PD-1 transfizierten HEK293T Zellen werden kultiviert, geerntet und 200000-500000 Zellen pro Ansatz mit dem jeweiligen Primärantikörper 1 h bei RT inkubiert. Nach anschließendem Waschen mit 250 µl FACS-Puffer, Zentrifugieren in der Eppendorf 5415R Zentrifuge (2000 rpm, 3 min) und Resuspendieren in 100 µl FACS-Puffer werden die Zellen für 20-30 min bei RT mit dem Sekundärantikörper inkubiert und im Anschluss der Waschvorgang wiederholt. Zur Detektion werden die Zellen mit 100 µl SA-PE (Verdünnung 1:700) versetzt und für 20 min inkubiert. Nach erneutem Waschen werden die Zellen mit 10 µl Propidiumiodid pro Ansatz versetzt und im FACS vermessen. Die erhaltenen Daten werden im Anschluss mit der Software Win List 3D, so bearbeitet, dass nur die lebenden Zellen betrachtet werden.

5.4.3.1 Bestimmung der Bindungsaffinität mittels Durchflusszytometrie

Zur Bestimmung der Bindungsaffinität des Konjugats werden die nicht transfizierten und mit PD-1 transfizierten HEK293T Zellen kultiviert, geerntet und 200000-500000 Zellen pro Ansatz für 1 h mit unterschiedlichen Mengen des Konjugatgemischs (1, 2, 5 oder 10 µg) inkubiert. Im Anschluss erfolgt die Detektion mit den Antikörpern wie in Kapitel 5.4.3 beschrieben.

5.4.3.2 Bestimmung der Mortalität mittels Durchflusszytometrie

Zur Bestimmung der Mortalitätsrate werden die nicht transfizierten (100000/Ansatz) und mit PD-1 transfizierten HEK293T Zellen (100000/Ansatz) kultiviert und für 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen des Konjugatgemischs (0, 1, 5 und 50 µg/ml) inkubiert. Anschließend werden die Zellen geerntet, in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert und mit 10 µl Propidiumiodid versetzt. Die Proben werden im Anschluss im FACS vermessen und die Zahl der toten Zellen bestimmt.

5.5 Spezielle Arbeitsmethoden

5.5.1 Isolierung von Gelonin aus dem Samen von *Gelonium multi-florum*

Alle Arbeiten zur Isolierung von Gelonin aus dem Samen von *Gelonium multiflorum* werden nach einer modifizierten Vorschrift von Stirpe *et al.* durchgeführt (Stirpe *et al.*, 1980; Hofmann, 1988).

Benötigte Lösungen:

Phosphatpuffer 1: 5 mM Natriumdihydrogenphosphat
 140 mM Natriumchlorid
 pH 7,4

Phosphatpuffer 2: 5 mM Natriumdihydrogenphosphat
 5 mM Ethylendiamintetraessigsäure
 pH 6,5

Durchführung:

Alle Arbeiten während der Isolierung von Gelonin werden bei 4 °C durchgeführt. Es werden 23 g geschälte Samen mit Phosphatpuffer 1 versetzt und in einem Mixer zerkleinert (30 s mixen, 30 s warten, 12-mal wiederholen). Das entstandene Homogenisat wird über Nacht gerührt, die groben Bestandteile über ein Mulltuch abfiltriert und die Suspension zentrifugiert (30000 x g, 30 min, 4 °C). Das Fett wird anschließend mit einem Plastiklöffel entfernt, der Überstand 6-mal für je 50 min gegen 5 l Phosphatpuffer 2 dialysiert und das Präzipitat erneut zentrifugiert (30000 x g, 30 min, 4 °C). Der Überstand wird auf die zuvor mit Phosphatpuffer 2 äquilibrierte Kationenaustauschersäule (l = 7 cm, d = 4 cm) (siehe Kap. 5.2.6.2) mit einer Flussrate von 3 ml/min aufgetragen und die Säule solange mit Phosphatpuffer 2 gewaschen, bis die Basislinie wieder erreicht wird. Dieser Vorgang wird mittels eines Durchflussphotometers bei 280 nm detektiert. Zur Elution des Gelonins wird ein NaCl-Gradient (0-0,3 M NaCl in Phosphatpuffer 2) angelegt. Das in einem Bereich von 0,1-0,2 M NaCl eluierte Gelonin wird gesammelt, mittels Ultrafiltration (VIVASPIN-20-Konzentrator, 10 kDa) eingengt und bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert.

5.5.2 Isolierung von rekombinantem Gelonin aus *E. coli*

Bei allen gentechnischen Methoden ist steriles Arbeiten erforderlich. Deshalb werden alle verwendeten Materialien, Geräte und Lösungen autoklaviert. Außerdem werden temperatur-empfindliche Lösungen über 0,22 µm sterilfiltriert und nicht autoklavierbare Materialien und Oberflächen werden mit einer 70%igen Ethanollösung desinfiziert. Die hier durchgeführten Methoden sind den Vorschriften von Sambrook *et al.* (Sambrook *et al.*, 1989) zu entnehmen.

5.5.2.1 Kulturmedien

Es werden die folgenden Fest- und Flüssigmedien zur Aufzucht von *E. coli* verwendet:

Benötigte Lösungen:

LB-Medium-Lösung:	2,5 % LB-Medium autoklavieren, abkühlen auf ca. 50 °C, 0,1 % Kanamycin-SL
Agar-Platten:	2,5 % LB-Medium 1,5 % Agar autoklavieren, abkühlen auf ca. 50 °C, 0,1 % Kanamycin-SL Petrischalen befüllen und fest werden lassen
Kanamycin-Stammlösung:	45 mM Kanamycin über 0,22 µm sterilfiltrieren
IPTG-Stammlösung:	1 M IPTG über 0,22 µm sterilfiltrieren

5.5.2.2 Herstellung kompetenter Zellen

Bei allen Klonierungsarbeiten ist die Herstellung von kompetenten Zellen, die eine Transformation eines Plasmids in eine Wirtszelle ermöglichen, von großer Bedeutung. Obwohl *E. coli* nicht natürlich kompetent ist, kann dies durch Behandlung mit Calciumchlorid künstlich erreicht werden. Die Durchführung erfolgt nach Badr (Badr, 2012). Hierbei ist zu beachten, dass alle Arbeiten nach dem Zellwachstum bei 4 °C durchgeführt werden und alle Lösungen vorgekühlt sind.

5.5.2.3 Transformation und Kompetenztest

Die kompetenten Zellen (*E. coli*, BL21(DE3)) werden aufgetaut, etwa 1 ng Plasmid-DNA zugegeben und 1 h auf Eis inkubiert. Die Zellen werden einem Hitzeschock von 2 min bei 42 °C ausgesetzt und danach 5 min auf Eis abgekühlt. Die Suspension wird mit 1 ml LB-Medium versetzt und 45 min bei 37 °C unter Schütteln (550 rpm) inkubiert. Danach werden je 2-mal 100 µl bzw. 2-mal 200 µl der Zellsuspension mit Hilfe eines Drigalski-Spatels auf Agar-Platten ausgestrichen. Die Platten werden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Befinden sich am nächsten Tag Kolonien auf den Platten, sind die Zellen kompetent bzw. die Transformation war erfolgreich.

5.5.2.4 Plasmidisolierung

Zur Isolierung von kleinen Mengen Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen wird das QIAprep Spin Miniprep Kit von Qiagen verwendet, und um größere Mengen Plasmid-DNA zu isolieren, wird das Endo Free Plasmid Maxi Kit von Qiagen eingesetzt. Die Durchführung erfolgt nach Anleitung des jeweiligen Kits.

5.5.2.5 Glycerinkulturen

Glycerinkulturen werden zur längerfristigen Lagerung von Bakterien verwendet. Hierzu werden 250 µl autoklaviertes Glycerin zu 750 µl Bakterienkultur gegeben, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80 °C gelagert.

5.5.2.6 Kulturbedingungen

Von einer Glycerinkultur (siehe Kap. 5.5.2.5) erfolgt ein Verdünnungsausstrich auf eine Agar-Platte, die über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert wird. Am nächsten Tag werden 25 ml einer LB-Medium-Lösung (siehe Kap. 5.5.2.1) mit einer einzelnen Kolonie angeimpft. Anschließend erfolgt eine Inkubation über Nacht bei 37 °C unter Schütteln (280 rpm). Mit 10 ml dieser Übernachtskultur werden 500 ml LB-Medium-Lösung (Großkultur) angeimpft. Auf eine ausreichende Belüftung ist zu achten, es sollten Kolben mit Schikanen verwendet werden.

5.5.2.7 Wachstumsmessungen

Das Wachstum der Bakterien kann durch regelmäßige Bestimmung der OD bei 600 nm im UV-VIS-Spektrometer verfolgt werden. Dies ist möglich, weil das Licht beim Durchgang durch die Bakteriensuspension gestreut wird. Die Anzahl und die Größe der Bakterien bestimmt die Stärke der Streuung (Süßmuth *et al.*, 1997). Als Blank für die Messung dient nicht angeimpftes LB-Medium.

5.5.2.8 Expression

Liegt die OD des Mediums zwischen 0,7 und 1,0, wird die Expression durch Zugabe der IPTG-Lösung induziert. Die Bakterien werden weiter bei 37 °C unter Schütteln (280 rpm) inkubiert, bis die Zellen in die stationäre Wachstumsphase übergehen. Anschließend wird die Expression durch Inkubation auf Eis (30 min) gestoppt und die Zellen werden für 20 min bei 8700 x g (4 °C) zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C aufbewahrt.

5.5.2.9 Zellyse

Benötigte Lösungen:

Waschpuffer: 20 mM Tris
pH 7,2

5. Experimenteller Teil

Resuspendierungspuffer:	20 mM Natriumdihydrogenphosphat 500mM Natriumchlorid 20 mM Imidazol pH 7,2
Lysozym-Stammlösung:	10 mg/ml Lysozym in Tris 100 mM, pH 8,0

Durchführung:

Das Zellpellet wird 2-mal mit 25 ml Waschpuffer gewaschen und zentrifugiert (10 min, 6400 x g, 4 °C). Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 25 ml Resuspendierungspuffer (mit Proteaseinhibitor-Tabletten) resuspendiert. Danach werden die Zellen mittels Ultraschall (70-80% Leistung) im Eisbad lysiert (12-mal 10 s). Nach der Lyse werden die löslichen von den unlöslichen Bestandteilen durch Zentrifugation abgetrennt (30000 x g, 30 min, 4 °C). Der Überstand wird bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert.

5.5.3 Isolierung von His₆^T-Gelonin₁₋₂₅₁ mittels Nickelaffinitätschromatographie

Das rekombinante Gelonin besitzt einen His-Tag und kann mittels Nickelaffinitätschromatographie isoliert werden. Die Isolierung erfolgt nach einer modifizierten Vorschrift von Hossann (Hossann, 2004).

Benötigte Lösungen:

Nickelsulfat-Lösung:	0,2 M Nickelsulfat
Bindungspuffer:	50 mM Natriumdihydrogenphosphat 0,5 M Natriumchlorid 20 mM Imidazol pH 7,2

Waschpuffer:	50 mM Natriumdihydrogenphosphat 0,5 M Natriumchlorid 100 mM Imidazol pH 7,2
Elutionspuffer:	50 mM Natriumdihydrogenphosphat 0,5 M Natriumchlorid 500 mM Imidazol pH 7,2
Regenerationspuffer:	20 mM Tris 500 mM Natriumchlorid 50 mM EDTA-Na ₂ -Salz pH 8,0
Dialysepuffer:	20 mM Natriumdihydrogenphosphat pH 7,2

Durchführung:

Alle Arbeiten werden bei 4 °C durchgeführt und mit einem Durchflussphotometer bei 280 nm protokolliert. Die Fraktionen werden gemäß dem Chromatogramm aufgefangen. Die Flussrate wird auf ca. 1 ml/min eingestellt und alle Pufferlösungen werden vor Gebrauch über 0,45 µm sterilfiltriert. Der Überstand wird erneut zentrifugiert (400000 x g, 4 °C, 30 min) und über 0,45 µm sterilfiltriert, bevor er auf die Säule gegeben wird. Die Säule wird zur Vorbereitung mit 10 ml Wasser gespült, mit 2 ml Nickelsulfat-Lösung aktiviert und wieder mit 10 ml Wasser gespült. Anschließend wird sie mit 10 ml Bindungspuffer äquilibriert und der Proteinüberstand wird aufgetragen. Die nicht gebundenen Proteine werden mit Bindungspuffer von der Säule gewaschen, bis die Basislinie wieder erreicht ist. Dann werden die unspezifisch gebundenen Proteine mit 10 ml Waschpuffer von der Säule gespült und das rekombinante Gelonin wird mit Elutionspuffer eluiert. Zum Abschluss wird die Säule mit 10 ml Regenerationspuffer entladen, mit 10 ml Wasser gespült und in 20%iger Ethanollösung bei 4 °C gelagert. Die Elutionsfraktion wird über Nacht bei 4 °C in 5 l Dialysepuffer dialysiert (siehe Kap. 5.2.3). Das Protein wird bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert.

5.5.3.1 Abspaltung des His-Tags von His₆^T-Gelonin₁₋₂₅₁

Zur Abspaltung des His-Tags wird ein Thrombin-Kit (Fa. Novagen) verwendet. Die Endopeptidase Thrombin bindet spezifisch an die Aminosäuresequenz LeuValProArgGlySer und spaltet dabei die Peptidbindung vor dem Glycin (Hossann, 2004).

Benötigte Lösungen:

Im Kit sind folgende Lösungen enthalten:

Human Thrombin (1, 2 U/μl)

10x Thrombin Cleavage Buffer

1x Thrombin Dilution/Storage Buffer

Durchführung:

Die Durchführung erfolgt nach der Anleitung des Kits. Hierbei wird Gelonin wie folgt mit den entsprechenden Lösungen versetzt und 16 h bei RT inkubiert: Es werden pro 900 μl Protein 100 μl 10x Cleavage Buffer hinzugegeben und pro mg Protein 0,83 μl Thrombin (Schanz, 2009). Nach der Abspaltung wird die Reaktionslösung zur Entfernung des 6x His-Tags mit Dialysepuffer (siehe Kap. 5.5.3) auf 6 ml aufgefüllt und mittels eines VIVASPIN-6-Konzentrators (Ausschlussgrenze 10 kDa) aufkonzentriert (siehe Kap. 5.2.4.1).

5.5.4 Isolierung des anti-PD-1-Antikörpers

Der monoklonale anti-PD-1-Antikörper wird von Dr. Rodriguez-Barbosa am IBIOMED hergestellt und isoliert. Während des Aufenthaltes in León erfolgte die Isolierung aus der Aszitesflüssigkeit (Klon 4 F10) oder aus dem Zellkulturüberstand (Klon 1 H10) mittels Protein-G-Affinitätschromatographie nach folgender Anleitung:

Benötigte Lösungen:

Bindungspuffer: 50 mM Natriumhydrogenphosphat
pH 6,0

Elutionspuffer: 0,1 M Glycin
pH 2,7

Neutralisierungspuffer: 1 M Tris
pH 9,0

Durchführung:

Die mit Protein-G-Sepharose gefüllte Säule wird bei einer Flussrate von 5 ml/min mit 50 ml Bindungspuffer äquilibriert. Der Überstand wird direkt auf die Säule gegeben, die Säule verschlossen und bei 4 °C für 4 h auf einem Rotator inkubiert. Der Überstand passiert die Säule und wird aufgesammelt. Im Anschluss wird der Antikörper mit Elutionspuffer bei einer Flussrate von 3 ml/min eluiert und in 3-ml-Fractionen gesammelt. In den Auffanggefäßen befinden sich je 200 µl Neutralisierungspuffer. Nach der Elution wird die Säule zuerst bei einer Flussrate von 6 ml/min mit 50 ml Elutionspuffer gespült und danach mit 50 ml Bindungspuffer. Die Lagerung erfolgt bei 4 °C in Bindungspuffer mit 0,1 % Natriumazid.

5.5.5 Herstellung des anti-PD-1-Gelonin-Konjugats

Alle bei der Herstellung des anti-PD-1-Gelonin-Konjugats verwendeten Lösungen werden entgast und mit Argon belüftet. Die Glasgefäße werden silanisiert (siehe Kap. 5.2.5), entgast und ebenfalls mit Argon belüftet. Die einzelnen Reaktionsschritte erfolgen alle unter Schutzgas, damit es nicht zur Oxidation der eingeführten Thiolgruppen kommt.

5.5.5.1 Modifizierung mit 2-Iminothiolan

Zur Kopplung von Gelonin an den anti-PD-1-Antikörper müssen zunächst in beide Proteine die für die Reaktion benötigten freien Thiolgruppen eingeführt werden. Hierzu werden die Proteine mit 2-Iminothiolan nach der Methode von Jue (Jue *et al.*, 1978) modifiziert. Die Durchführung erfolgt nach der Anleitung von Kreilinger (Kreilinger, 2001).

Benötigte Lösungen:

EDTA 1: 100 mM Ethylendiamintetraessigsäure
pH 7

TEA 1: 500 mM Triethanolamin
pH 8

TEA 2:	1 M Triethanolamin pH 8,3
2-Iminothiolan:	200 mM 2-Iminothiolan in TEA 2
Phosphatpuffer:	100 mM Natriumdihydrogenphosphat 5 mM Ethylendiamintetraessigsäure pH 6,5

Durchführung:

Die jeweiligen Proteine werden mit je 120 µl TEA 1 und 30 µl EDTA 1 pro ml Proteinlösung versetzt, 15 min entgast und mit Argon belüftet. Anschließend wird der entsprechende Überschuss an 2-Iminothiolan (siehe Kap. 3.1.2.1 und 3.1.3.1) zugegeben und es erfolgt nach erneutem Entgasen (15 min) und Belüften eine 60-90-minütige Inkubation auf Eis. Um überschüssiges 2-Iminothiolan abzutrennen, wird das Reaktionsgemisch auf eine mit Phosphatpuffer äquilibrierte Sephadex-G-25-Säule (l = 10 cm, d = 1 cm, Trennbereich 1000-5000 Da) mit einer Flussrate von 1 ml/min aufgetragen. Der Verlauf der Gelfiltrationschromatographie (siehe Kap. 5.2.6.3) wird mit einem Durchflussphotometer bei 280 nm verfolgt und die Fraktion, die das modifizierte Protein enthält, unter Schutzgas aufgesammelt.

5.5.5.2 Einbaubestimmung von Thiolgruppen

Die Einbaubestimmung von Thiolgruppen wird entsprechend der Methode von Grassetti (Grassetti *et al.*, 1967) durchgeführt und erfolgt nach dem Schema von Rousselle (Rousselle, 1996). Das eingesetzte 4,4'-Dithiodipyridin reagiert mit freien Thiolgruppen zu 4-Thiopyridon, das eine starke Absorption bei 324 nm zeigt. Da das ursprünglich eingesetzte Disulfid hier keine Absorption mehr zeigt, kann die Reaktion photometrisch bestimmt werden.

Benötigte Lösungen:

EDTA 2:	50 µM Ethylendiamintetraessigsäure pH 6,0
---------	--

MEA-Stammlösung: 100 mM 2-Mercaptoethylamin

MEA-Gebrauchslösung: 2 ml EDTA 2
10 µl MEA-SL
auf Eis stellen

DTP-Lösung: 5 mM 4,4'-Dithiodipyridin

Durchführung:

Es werden 250 µl der Proteinlösung (modifiziertes Gelonin oder Antikörper) mit 450 µl Phosphatpuffer und 28 µl DTP gemischt und für 15 min bei RT inkubiert. Im Anschluss erfolgt die Bestimmung der Absorption bei 324 nm und es kann mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten des entstandenen 4-Thiopyridons ($19800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), der Konzentration und des Molekulargewichts des modifizierten Proteins das molare Verhältnis von Sulfhydrylgruppen zu Protein berechnet werden.

5.5.5.3 Einführung von Maleimidgruppen

Um die beiden modifizierten Proteine miteinander zu koppeln, wird noch ein sogenannter Spacer benötigt, der die Proteine durch Bildung einer Thioetherbrücke miteinander verknüpft. Hierzu wird Bis-(maleimido)-methylether (BMME) eingesetzt und nach der Anleitung von Kreilinger (Kreilinger, 2001) zunächst an das mit Thiolgruppen modifizierte Gelonin gebunden.

Benötigte Lösungen:

BMME-Stammlösung: 170 mM Bis-(maleimido)-methylether
in DMF (frisch destilliert)

Durchführung:

Das wie in Kap. 5.5.5.1 beschrieben mit Thiolgruppen modifizierte Gelonin wird mit dem entsprechenden Überschuss (siehe Kap. 3.1.2.2 und 3.1.3.2) an BMME versetzt und 30 min bei RT inkubiert. Im Anschluss wird das Reaktionsgemisch in einem VIVASPIN-6-Konzentrator (Ausschlussgrenze 10 kDa) durch Zentrifugation ($5000 \times g$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$) auf etwa 1 ml

eingengt und zum Entfernen des überschüssigen BMME analog zu Kapitel 5.5.5.1 auf die Sephadex-G-25-Säule gegeben. Das modifizierte Protein wird unter Schutzgas aufgefangen.

5.5.5.4 Einbaubestimmung von Maleimidgruppen

Zur Bestimmung der eingebauten Maleimide wird das Verfahren nach Ishikawa (Ishikawa *et al.*, 1983) verwendet. Bei dieser Methode reagieren die enthaltenen Maleimide mit einem definierten Überschuss an 2-Mercaptoethylamin und somit kann durch Bestimmung der restlichen Thiolgruppen die Anzahl der Maleimidgruppen berechnet werden. Die Durchführung erfolgt nach dem Schema von Rousselle (Rousselle, 1996).

Benötigte Lösungen:

Zur Bestimmung der Einbaurate der Maleimidgruppen wurden die Reagenzien aus Kap. 5.5.5.1 verwendet.

Durchführung:

Es werden 200 µl mit Maleimidgruppen modifiziertes Protein mit 430 µl Phosphatpuffer und 70 µl MEA-Gebrauchslösung versetzt und für 20 min bei 30 °C inkubiert. Im Anschluss werden 28 µl DTP zugegeben und 15 min bei RT inkubiert. Durch Bestimmung der Absorption bei 324 nm kann mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten des entstandenen 4-Thio-pyridons ($19800 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), der Konzentration und des Molekulargewichts des modifizierten Proteins das molare Verhältnis von Maleimidgruppen zu Protein berechnet werden.

5.5.5.5 Kopplung der modifizierten Proteine

Das mit Maleimidgruppen modifizierte Gelonin wird mit dem mit Sulfhydrylgruppen modifizierten Antikörper je nach Ansatz in unterschiedlichen Verhältnissen (Gelonin-BMME: AK-SH, 1:1, 2:1, 1:2, 3:2, 2:3) vereinigt und in einem VIVASPIN-6-Konzentrator (Ausschlussgrenze 10 kDa) durch Zentrifugation (5000 x g, 4 °C) auf etwa 1 ml eingengt. Nach Entgasen und Belüften mit Argon wird das Reaktionsgemisch bei 4 °C bis zur Weiterverarbeitung inkubiert.

5.5.5.6 Aufreinigung des Konjugats

Zur Entfernung von freiem Gelonin bzw. freiem Antikörper aus der Reaktionslösung und somit zur Aufreinigung des Konjugats werden die im Folgenden aufgeführten Methoden eingesetzt.

5.5.5.6.1 Aufreinigung mittels HPLC

Hierbei handelt es sich um eine chromatographische Aufreinigungsmethode, bei der eine HPLC (siehe Kap. 5.2.6.4) (Fa. Beckmann) mit einer Agilent ZORBAX-Bio-Series-GF-250-Säule (Fa. Agilent Technologies) verwendet wird.

Benötigte Lösungen:

PBS-Puffer:	130 mM NaCl
	2,5 mM Natriumdihydrogenphosphat
	4,5 mM Dinatriumhydrogenphosphat
	pH 7,2

Durchführung:

Das Reaktionsgemisch wird über 0,22 µm sterilfiltriert oder zentrifugiert (Eppendorf 5415C, 13000 rpm, 10 min), in den mit der Säule verbundenen Schleifen-Injektor (50, 250 oder 500 µl) injiziert und somit dem Fließmittel beigemischt. Bei einer Flussrate von 0,5 oder 1 ml/min werden die einzelnen Fraktionen entsprechend dem Chromatogramm aufgesammelt.

5.5.5.6.2 Aufreinigung mittels ÄKTA

Dies ist eine weitere chromatographische Aufreinigungsmethode bei der eine ÄKTA (siehe Kap. 5.2.6.5) (Fa. GE Healthcare) mit einer Superdex-200-10/300-GL- oder einer Superdex-75-10/300-GL-Säule (Fa. GE Healthcare) eingesetzt wird.

Benötigte Lösungen:

PBS-Puffer wie in Kap. 5.5.4.6.1 beschrieben.

Durchführung:

Das Reaktionsgemisch wird zentrifugiert (Eppendorf 5415C, 13000 rpm, 10 min) und es werden 500 µl in den Injektor injiziert und auf die Säule gegeben. Die Fraktionen werden bei einer Flussrate von 0,8 ml/min aufgesammelt und mittels des Chromatogramms den einzelnen Peaks zugeordnet.

5.5.5.6.3 Aufreinigung mittels Nickel-Affinitätschromatographie

Das Konjugat aus rekombinantem Gelonin und dem anti-PD-1-Antikörper ermöglicht auf Grund des in Gelonin enthaltenen His-Tags, die Aufreinigung des Reaktionsgemisches mit Hilfe der Nickelaffinitätschromatographie (siehe Kap. 5.2.6.1).

Benötigte Lösungen:

Es werden die in Kap. 5.5.2.10 eingesetzten Lösungen verwendet.

Durchführung:

Das Reaktionsgemisch wird über Nacht bei 4 °C gegen 5 l Bindungspuffer dialysiert (siehe Kap. 5.2.3). Nach einer Zentrifugation der Reaktionslösung (Eppendorf 5415C, 13000 rpm, 10 min) werden die Puffer und das Gemisch in der in Kap. 5.5.3 angegebenen Reihenfolge auf die Säule gegeben und bei einer Flussrate von ca. 1 ml/min werden die Fraktionen gesammelt und mittels des Chromatogramms den Peaks zugeordnet. Die benötigten Fraktionen werden über Nacht bei 4 °C gegen 5 l Dialysepuffer (siehe Kap. 5.5.3) dialysiert.

5.5.6 Herstellung des monoklonalen anti-Gelonin Antikörpers

Die Herstellung von monoklonalen Antikörpern erfolgt nach der im Jahre 1975 erstmals von Köhler und Milstein (Köhler und Milstein, 1975) beschriebenen Hybridom-Technik (siehe Kap. 1.1.2.2). Hierbei werden antikörperproduzierende Zellen mit unsterblichen Zellen hybridisiert ohne ihre Fähigkeit, Antikörper zu synthetisieren, zu verlieren (Liddell und Weeks, 1996).

5.5.6.1 Immunisierung von BALB/c Mäusen

Zur Produktion des monoklonalen Antikörpers werden zunächst 5 weibliche 10 Wochen alte BALB/c Mäuse (Fa. Charles River) mit rekombinantem Gelonin ohne His-Tag immunisiert. Eine weitere Maus dient als Kontrolle und wird nicht immunisiert. Die Herstellung der Gelonin-Adjuvans-Emulsion erfolgt nach Herbert und Kristensen (Herbert und Kristensen, 1986).

Durchführung:

Für die 1. Immunisierung (*priming*) werden pro Maus 20 µg Antigen injiziert. Hierzu werden 500 µl einer Geloninlösung in PBS (0,4 mg/ml) über 0,22 µm sterilfiltriert und mit 1 ml Freund's Adjuvant (*complete*) durch 20 min Vortexen gemischt. Während des Vortexens wird die Emulsion zwischendurch auf Eis abgekühlt. Es werden 150 µl der homogenen Emulsion pro Maus intraperitoneal mit einer 1-ml-Spritze und passender Kanüle (Sterican 100, 27 G x 4/5, 0,40 x 20 mm) injiziert. Bei den weiteren Immunisierungen (*boosts*) werden nur 10 µg Antigen pro Maus injiziert und es wird Freund's Adjuvant (*incomplete*) verwendet. Die letzte Immunisierung (*final boost*) erfolgt 3 Tage vor der Tötung der Maus mit 100 µg Antigen und ohne Adjuvans. Das genaue Immunisierungsprotokoll ist in Kapitel 3.2.1 aufgeführt.

5.5.6.2 Entnahme einer Blutprobe bei der Maus

Zur Bestimmung des Antikörpertiters und zum Nachweis einer erfolgreichen Immunisierung wird den Mäusen eine Blutprobe entnommen. Die Maus wird mit der Hand fixiert, die *Vena facialis* mit Hilfe einer Kanüle (Sterican 100, 25 G x 5/8, 0,50 x 16 mm) angeritzt und 2-3 Tropfen Blut werden in einem heparinisierten Gefäß gesammelt. Das Blut wird mit PBS verdünnt (1:10), 2 h bei 4 °C abesert, zentrifugiert (Eppendorf 5415C, 5000 rpm, 5 min) und im ELISA (siehe Kap. 5.4.1) in unterschiedlichen Verdünnungen (1:50, 1:100; 1:200, 1:500, 1:1000; 1:2000; 1:5000, 1:10000, 1:20000) auf gebildete Antikörper untersucht. Als Antigen dient hierbei rekombinantes Gelonin und als Sekundärantikörper wird ein anti-mouse-IgG-Antikörper eingesetzt.

5.5.6.3 Präparation der Milzzellen

Drei Tage vor der Tötung der Maus werden 100 µl des Antigens intraperitoneal injiziert. Das Tier wird durch Genickbruch getötet, aufgeschnitten und die Milz entnommen. Die Milz wird mit dem Stempel einer Spritze durch ein Sieb in 10 ml PBS zerkleinert und das Sieb mit 3 ml PBS nachgespült. Die Zellsuspension wird in ein Röhrchen überführt und nach 5 min werden die groben Gewebestücke entfernt, indem der Überstand in ein sauberes Röhrchen pipettiert wird. Die Zellen werden 3-mal durch Zentrifugation (Heraeus Labofuge A, 2000 rpm, 20 °C, 5 min) mit 10 ml PBS gewaschen und entweder direkt für eine Fusion eingesetzt oder eingefroren (siehe Kap. 5.3.2).

5.5.6.4 Zellfusion

Die Fusion von Milzzellen mit der Myelomzelllinie (X63Ag8.653) wird nach der Vorschrift von Moldenhauer (Moldenhauer, 2007) durchgeführt. Bei der Fusion sollten alle Zeitangaben eingehalten werden und alle Lösungen auf 37 °C vorgewärmt sein.

Benötigte Lösungen:

Kulturmedium:	500 ml RPMI 1640
	50 ml FKS (hitzeinaktiviert)
	5 ml Pen/Strep
	2,5 ml Natriumpyruvat
	5 ml L-Glutamin
PEG-Lösung:	20 g Polyethylenglykol
	4,2 ml DMSO
	23,8 ml PBS

Das PEG wird autoklaviert und auf etwa 60 °C abgekühlt bevor die PBS/DMSO Lösung unter sterilen Bedingungen hinzugegeben wird. Es wird solange geschwenkt, bis keine Schlieren mehr zu sehen sind.

5. Experimenteller Teil

HAT-Medium:	300 ml RPMI 1640
	30 ml FKS (hitzeinaktiviert)
	3 ml L-Glutamin
	3 ml Pen/Strep
	6,6 ml HAT-Zusatz
HT-Medium:	500 ml RPMI 1640
	50 ml FKS (hitzeinaktiviert)
	5 ml L-Glutamin
	5 ml Pen/Strep
	11,1 ml HT-Zusatz

Durchführung:

Damit sich die Myelomzellen (X63Ag8.653) zum Zeitpunkt der Fusion in der exponentiellen Wachstumsphase befinden, werden sie 14 Tage vor der Durchführung in Kultur genommen (siehe Kap. 5.3.5.2) und 3 Tage vor der Fusion noch einmal verdünnt, indem 20 ml der Zellsuspension in 150 ml Kulturmedium gegeben werden. Am Tag der Fusion werden die Myelomzellen durch Zentrifugation (Heraeus Labofuge A, 2000 rpm, 20 °C, 5 min) geerntet, die Pellets in je 1 ml PBS resuspendiert, vereinigt und 3-mal mit je 50 ml PBS durch Zentrifugation (Heraeus Labofuge A, 2000 rpm, 20 °C, 5 min) gewaschen. Anschließend werden die Milzzellen entweder frisch präpariert (siehe Kap. 5.5.6.3) oder aufgetaut (siehe Kap. 5.3.3) und 3-mal mit je 15 ml PBS durch Zentrifugation (Heraeus Labofuge A, 2000 rpm, 20 °C, 5 min) gewaschen. Die vorbereiteten Milz- und Myelomzellen werden in 1 ml PBS gelöst, vereinigt und in 50 ml PBS zusammen zentrifugiert (Heraeus Labofuge A, 2000 rpm, 20 °C, 5 min). Der Überstand wird verworfen, das Pellet durch Antippen mit dem Finger von der Wand gelöst und in 1,5 ml PEG-Lösung resuspendiert. Nach einer Einwirkzeit von 90 s werden innerhalb von 60 s 1,5 ml PBS durch langsames Zutropfen an der Wand entlang zugegeben. Es erfolgt eine weitere Verdünnung durch Zugabe von 10 ml PBS innerhalb von 3-5 min durch Hinzutropfen unter leichtem Schütteln. Zum Abschluss werden nach 60 s Wartezeit noch 10 ml PBS auf einmal dazugegeben und die Suspension zentrifugiert (Heraeus Labofuge A, 2000 rpm, 20 °C, 5 min). Das Pellet wird vorsichtig in 10 ml HAT-Medium resuspendiert, in weitere 300 ml HAT-Medium überführt, je 200 µl in die Näpfe von 96-Well-Platten einpipettiert und anschließend werden die Platten bei 37 °C und

5 % CO₂ kultiviert. Das Fusionsgemisch reicht aus, um 15 Platten zu füllen, es kann aber auch ein Teil eingefroren (siehe Kap. 5.3.2) werden. Nach etwa 14 Tagen wird ein Mediumwechsel von HAT- zu HT-Medium durchgeführt, indem das alte Medium abpipettiert und durch neues ersetzt wird.

5.5.6.5 Nachweis positiver Hybridome

Nach 8 bzw. 14 Tagen können die Hybridomüberstände in den Näpfen der Mikrotiterplatten mittels ELISA (siehe Kap. 5.4.1) auf Antikörperproduktion untersucht werden. Hierzu werden die Näpfe zuvor mit Hilfe eines Mikroskops auf das Wachstum von Hybridomzellen kontrolliert und aus den entsprechenden Näpfen werden je 100 µl Überstand für den ELISA entnommen. Das entnommene Medium wird wieder durch 100 µl frisches ersetzt.

5.5.6.6 Klonierung positiver Hybridome

Damit eine Hybridomkultur als monoklonal betrachtet werden kann, sollte sie 1- bis 2-mal rekloniert werden. Hierzu wird die Methode des „*limiting dilution cloning*“ angewendet. Das bedeutet, die Zellen werden so verdünnt und ausgesät, dass sich statistisch gesehen nur eine Zelle in einem Napf befindet (Peters und Baumgarten, 1990).

Benötigte Lösungen:

HT-Medium:	siehe Kap. 5.5.6.4
Klonierungsmedium:	17,8 ml HT-Medium 2,2 ml Hybridoma Cloning Supplement

Durchführung:

Der Inhalt eines positiven Napfes wird mit 200 µl HT-Medium verdünnt und die Zellen vor der Entnahme aufgewirbelt und in ein Gefäß überführt. Die Zellzahl wird bestimmt (siehe Kap. 5.3.4) und es werden verschiedene Verdünnungen der Zellsuspension mit Klonierungsmedium angesetzt, um so wenige Zellen wie möglich pro Napf auszusäen. Die Inkubation erfolgt im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂. Nach 12 Tagen wird die Antikörperproduktion mittels ELISA (siehe Kap. 5.4.1) getestet und positive Klone ein zweites Mal kloniert oder als Reserve eingefroren (siehe Kap. 5.3.2).

5.5.6.7 Expansion positiver Klone und Produktion des Antikörpers

Zur Produktion des monoklonalen Antikörpers in größeren Mengen können die zwei im Folgenden dargestellten Methoden angewendet werden:

5.5.6.7.1 Produktion des Antikörpers in der Zellkultur

Ein positiver Klon aus einem Napf kann mittels Expansion in größere Volumina überführt und vermehrt werden.

Benötigte Lösungen:

Kulturmedium:	500 ml RPMI 1640
	50 ml FKS (hitzeinaktiviert)
	5 ml Pen/Strep
	5 ml L-Glutamin

Durchführung:

Die Zellen in einem positiven Napf werden aufgewirbelt, mit 200 µl Medium verdünnt, in ein Kryoröhrchen überführt und die Zellzahl bestimmt (siehe Kap. 5.3.4). Die einzelnen Klone werden in unterschiedliche Volumina überführt, entweder in eine 24-Well-Platte oder eine 25-cm²-Zellkulturflasche und ein Teil wird als Reserve eingefroren (siehe Kap. 5.3.2). Nach 7 Tagen wird der Überstand nach Zentrifugation (Heraeus Labofuge A, 2000 rpm, 5 min) im ELISA (siehe Kap. 5.4.1) auf die Produktion von Antikörpern untersucht und die positiven Klone in ein größeres Volumen (25-cm²-Flasche oder 75-cm²-Flasche) überführt. Nach weiteren 7 Tagen wird erneut die Antikörperproduktion im ELISA getestet und die positiven Klone werden weiter vermehrt und zum Teil eingefroren. Alle 7 Tage wird der Überstand gesammelt und durch neues Medium ersetzt.

5.5.6.7.2 Produktion des Antikörpers aus Aszites

Der Vorteil dieser Methode ist, dass die Antikörperkonzentration in der Aszitesflüssigkeit höher ist als im Zellkulturüberstand, somit lassen sich größere Mengen Antikörper produzieren. Dieses Verfahren wurde am IBIOMED (León) zusammen mit Dr. Rodriguez-Barbosa durchgeführt.

Durchführung:

Die intraperitoneale Injektion von 0,5 ml Pristan in 4 Mäuse erfolgt 12 Tage vor der Immunisierung mit den Hybridomzellen. Die Zellen eines positiven Klons werden aufgetaut (siehe Kap. 5.3.3) und in Kulturmedium (siehe Kap. 5.5.6.7.1) für 2 Wochen kultiviert. Der Überstand wird abzentrifugiert (Eppendorf 5415 R, 1300 rpm, 5 min), die Zellzahl bestimmt (siehe Kap. 5.3.4) und die Zellen in 8 ml PBS resuspendiert. Es werden pro Maus 2 ml der Suspension (2×10^6 Zellen) intraperitoneal mit einer 1-ml-Spritze und passender Kanüle (Sterican 100, 27 G x 4/5, 0,40 x 20 mm) injiziert. Nach 18 Tagen werden die Mäuse durch CO₂-Begasung getötet und die Aszitesflüssigkeit durch Punktion aus der Bauchhöhle entnommen. Die Flüssigkeit wird 4 Tage bei 4 °C gelagert und es bilden sich 3 Phasen. Die obere Ölphase wird verworfen, der Überstand und die Zellen zentrifugiert (Eppendorf 5415 R 10000 rpm, 10 min). Aus dem Überstand kann mittels Protein-G-Affinitätschromatographie (siehe Kap. 5.5.6.10) der Antikörper isoliert werden.

5.5.6.8 Isotypisierung des Antikörpers

Zur Bestimmung der optimalen Aufreinigungsmethode für den Antikörper wird eine Isotypisierung mit Hilfe der „IsoQuick™ Strips for Mouse Monoclonal Isotyping“ (Fa. Sigma) durchgeführt. Des Weiteren wird zur Kontrolle ein ELISA (siehe Kap. 5.4.1) mit den entsprechenden Sekundärantikörpern (anti-mouse-IgG oder -IgM) durchgeführt.

5.5.6.9 Isolierung und Aufreinigung des Antikörpers aus der Zellkultur mittels Protein-G-Affinitätschromatographie

Da es sich bei den synthetisierten Antikörpern um IgG-Antikörper handelte, konnten diese mittels Protein-G-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Die Durchführung erfolgt nach der Anleitung der Fa. GE Healthcare. Alle Arbeiten finden bei 4 °C statt und die Lösungen werden über 0,45 µm sterilfiltriert.

Benötigte Lösungen:

Tris-Puffer: 1 M Tris
pH 9

Phosphatpuffer:	20 mM Natriumdihydrogenphosphat pH 7,4
Elutionspuffer:	0,1 M Glycin pH 2,7
PBS-Puffer:	siehe Kap. 5.5.5.6.1

Durchführung:

Der Hybridomüberstand (50 ml) wird zentrifugiert (Beckman J2-21, 30 min, 8700 rpm), über 0,22 µm sterilfiltriert und der pH-Wert auf 7,4 eingestellt. Die Protein-G-Säule wird bei einer Flussrate von 1 ml/min mit 10 ml Phosphatpuffer äquilibriert und anschließend wird der Hybridomüberstand mit einer Flussrate von 0,5 ml/min aufgetragen. Nach zweimaligem Durchlaufen des Überstandes wird die Säule solange mit Phosphatpuffer gespült, bis die Basislinie wieder erreicht ist. Der Antikörper wird mit Elutionspuffer von der Säule eluiert und in Fraktionen zu je 1 ml, in 120 µl Tris-Puffer enthaltenden Gefäßen gesammelt. Zur Regeneration wird die Säule mit 10 ml Phosphatpuffer gespült und in 20%igem Ethanol gelagert. Der pH Wert der einzelnen Fraktionen wird kontrolliert und mit Tris-Puffer auf 7,4 eingestellt. Es erfolgt eine Dialyse (siehe Kap. 5.2.3) der vereinigten Fraktionen in 5 l PBS-Puffer.

5.5.6.10 Isolierung und Aufreinigung des Antikörpers aus der Aszitesflüssigkeit mittels Protein-G-Affinitätschromatographie

Der Überstand, der aus der Aszitesflüssigkeit gewonnen wird, kann auch mittels Protein-G-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Die Isolierung des Antikörpers erfolgt hier nach der Anleitung (siehe Kap. 5.5.4) von Dr. Rodriguez-Barbosa (IBIOMED, León).

5.5.6.11 Bestimmung des Antikörpertiters

Zur Bestimmung des Antikörpertiters wird ein ELISA (siehe Kap. 5.4.1) mit Gelonin als Antigen und dem anti-Gelonin-Antikörper als Primärantikörper in unterschiedlichen Verdünnungen durchgeführt.

5.5.6.12 Bestimmung der Kreuzreaktivität

Um zu untersuchen, wie spezifisch die Antikörper mit Gelonin reagieren, wird die Kreuzreaktivität bestimmt. Hierzu wird sowohl ein ELISA (siehe Kap. 5.4.1) als auch ein Western-Blot (siehe Kap. 5.4.2) mit rekombinantem Gelonin, Gelonin aus Samen und anderen Proteinen (β -Galactosidase, BSA, Chymotrypsin, Lysozym, Cytochrom c und Aprotinin) als Antigen durchgeführt.

5.5.7 *In-vitro*-Translationsassay

Die Toxizität gegenüber eukaryontischen Ribosomen kann mittels des *in-vitro*- Translationsassay in einem zellfreien System ermittelt werden (Pelham und Jackson, 1976; Jackson *et al.*, 1983)

Benötigte Lösungen:

Lösung A:	2,5 mg Creatinphosphokinase 250 μ l Wasser 250 μ l Glycerin
Tris-Puffer:	20 mM Tris 5 mM Kaliumchlorid pH 8,2
Lösung B:	7,5 mg Hämin in 11,5 ml Tris-Puffer lösen über Nacht bei 4 °C, sterilfiltrieren
Lösung C:	6,7 mg Creatinphosphat 100 μ l Wasser
Lösung D:	5 mM Magnesiumchlorid 2 M Kaliumchlorid
Lösung E:	L-[U 14 C]-Valin (1,85 MBq/ml)

5. Experimenteller Teil

Lösung F:	7,5 mM Alanin 7,5 mM Leucin 5 mM Aspartat 5 mM Glutamat 5 mM Glycin 5 mM Histidin 5 mM Lysin 5 mM Serin 3,75 mM Arginin 3,75 mM Asparagin 3,75 mM Glutamin 3,75 mM Isoleucin 3,75 mM Phenylalanin 3,75 mM Prolin 3,75 mM Threonin 3,75 mM Tryptophan 3,75 mM Tyrosin 2,5 mM Cystein 2,5 mM Methionin am Versuchstag bei 37 °C lösen
Valin-Lösung:	1 M Natriumhydroxid 0,5 M Wasserstoffperoxid (30 %) 1 mg/ml Valin
Lysat:	Kaninchen-Retikulozyten-Lysat, unbehandelt
8%ige TCA-Lösung:	80 g Trichloressigsäure ad 1 l Wasser
25%ige TCA-Lösung:	50 g Trichloressigsäure ad 200 ml Wasser

5. Experimenteller Teil

Szintillationscocktail:	Rotiszint ecoplus (Fa. Roth)
komplementiertes Lysat:	970 µl Lysat 10 µl Lösung A 20 µl Lösung B
Master Mix:	50 µl Lösung C 50 µl Lösung D 80 µl Lösung E 20 µl Lösung F

Durchführung:

Von den zu untersuchenden Proben wird je eine Verdünnungsreihe mit 7 verschiedenen Konzentrationen (siehe Kap. 3.1.5.3) angefertigt. Hierbei ist zu beachten, dass die Proben in der Zellkulturplatte nochmals um den Faktor 11 verdünnt werden. Als Negativkontrolle wird BSA verwendet. Als Positivkontrolle dient Gelonin. Je 5 µl der Proben werden in die Näpfe einer auf 37 °C vorgewärmten 96-Well-Platte einpipettiert und es werden 40 µl komplementiertes Lysat hinzugegeben. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei 37 °C werden 10 µl Mastermix pro Napf dazugegeben und es wird weiter bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss werden nach 45 min und 65 min 6 µl Probe aus den Näpfen entnommen, in 1 ml kaltes Wasser pipettiert, 500 µl Valinlösung dazugegeben und bei 37 °C 20 min inkubiert. Die Proben werden mit 2 ml 25%iger TCA gefällt und 45 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend werden die Proben über 2 Whatman-GF/C-Filter 2,4 cm filtriert, 2-mal mit 2 ml 8%iger TCA gewaschen, die Filter in Röhrchen überführt und über Nacht getrocknet. Die Messung der Proben erfolgt nach Zugabe von 3 ml Szintillisationscocktail und Vortexen im β -Counter.

6. Anhang

6.1 Aminosäuresequenzen von natürlichem Gelonin

In der Literatur wurden zwei unterschiedliche Aminosäuresequenzen von natürlichem Gelonin von Nolan (Nolan *et al.*, 1993) und Rosenblum (Rosenblum *et al.*, 1995) publiziert. Mittels FT-ICR-MS (*Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry*) wurde von Daubenfeld (Daubenfeld *et al.*, 2005) gezeigt, dass die von Nolan *et al.* publizierte Aminosäuresequenz der von Gelonin entspricht.

```

Nolan      | 1  GLDTVSFSTKGATYITYVNFLNELRVKLLKPEGNSHGIPLLRKKCDDPGKCFVLVALSNDN
Rosenblum | 1  GLDTVSFSTKGATYITYVNFLNELRVKLLKPEGNSHGIPLLRKG-DDPGKCFVLVALSNDN
          *  *****
          *  *****

Nolan      | 61  GQLAEIAIDVTSVYVVGYQVRNRSYFFKDAPDAAAYEGLFKNTIK-----TRLHFHFGGS
Rosenblum | 60  GQLAEIAIDVTSVYVVGYQVRNRSYFFKDAPDAAAYEGLFKNTIKNPLLFGGKTRLHFHFGGS
          *  *****
          *  *****

Nolan      | 113 YPSLEGEKAYRETTDLGIEPLRIGIKKLDENAIIDNYKPTIASSLLVVIQMVSEAAARFTF
Rosenblum | 120 YPSLEGEKAYRETTDLGIEPLRIGIKKLDENAIIDNYKPTIASSLLVVIQMVSEAAARFTF
          *  *****
          *  *****

Nolan      | 173 IENQIRNNFQQRIRPANNTISLENKWGKLSFQIRTSGANGMFSEAVELERANGKYYVTA
Rosenblum | 180 IENQIRNNFQQRIRPANNTISLENKWGKLSFQIRTSGANGMFSEAVELERANGKYYVTA
          *  *****
          *  *****

Nolan      | 233 VDQVKPKIALLLKFVDKDPK | 251 AS -> 28.172,20 Da
Rosenblum | 240 VTQVKPKIALLLKFVDKDPE | 258 AS -> 28.811,89 Da
          *  *****
          *  *****

```

Abbildung 6.1: Aminosäuresequenzenvergleich von natürlichem Gelonin nach Nolan (Nolan *et al.*, 1993) und Rosenblum (Rosenblum *et al.*, 1995): Die angegebenen Molekulargewichte berücksichtigen keine post-translationalen Modifikationen, sondern ergeben sich ausschließlich aus der Aminosäuresequenz. *: Identische AS; -: AS nur in einem Protein (Hossann, 2004).

6.2 DNA und Aminosäuresequenz von His₆^T-Gelonin₁₋₂₅₁

In der DNA- und Aminosäuresequenz von rekombinantem Gelonin sind alle 251 Aminosäuren des natürlichen Gelonins enthalten (Swissprot P33186, Nolan *et al.*, 1993). Außerdem sind ein N-terminaler His-Tag und eine Schnittstelle für Thrombin zur Abspaltung des His-Tags enthalten. Es ergibt sich eine berechnete Masse von 30494,72 Da. Hierbei ist das Methionin formyliert (M*). Nach Abspalten des His-Tags beträgt die Masse 28584,66 Da. Der berechnete pI-Wert beträgt 9,22 bzw. 9,12 bei abgespaltenem His-Tag (Hossann, 2004).

```

1  ATGGGCAGCA GCCATCATCA TCATCATCAC AGCAGCGGCC TGGTGCCGCG CGGCAGCCAT
   M* G S S H H H H H S S G L V P R G S H
61  ATGGGCCTGG ATACCGTGAG CTTCAGCACC AAAGGCGCCA CCTATATTAC CTATGTGAAC
   M G L D T V S F S T K G A T Y I T Y V N
121 TTCCTGAACG AACTGCGTGT GAAACTGAAA CCGGAAGGCA ACAGCCATGG CATTCCGCTG
   F L N E L R V K L K P E G N S H G I P L
181 CTGCGTAAAA AATGCGATGA TCCGGGCAAA TGCTTCGTGC TGGTGCGCT GAGCAACGAT
   L R K K C D D P G K C F V L V A L S N D
241 AACGGCCAGC TAGCGGAAAT TGCGATTGAT GTGACCAGCG TGTATGTGGT GGGCTATCAG
   N G Q L A E I A I D V T S V Y V V G Y Q
301 GTGCGTAACC GTAGCTATTT CTTCAAAGAT GCGCCGGATG CGGCGTATGA AGGCCTGTTC
   V R N R S Y F F K D A P D A A Y E G L F
361 AAAAAACACCA TAAAACCCG TCTGCATTTT GCGGCAGCT ATCCGAGTCT AGAAGGCGAA
   K N T I K T R L H F G G S Y P S L E G E
421 AAAGCGTATC GTGAAACCAC CGATCTGGGC ATTGAACCGC TGCGTATTGG CATTAAAAAA
   K A Y R E T T D L G I E P L R I G I K K
481 CTGGATGAAA ACGCGATTGA TAACTATAAA CCGACCGAAA TTGCGAGCAG CCTGCTGGTG
   L D E N A I D N Y K P T E I A S S L L V
541 GTGATTCAGA TGGTGAGCGA AGCGGCGCGT TTCACCTTCA TTGAAAACCA GATTCGTAAC
   V I Q M V S E A A R F T F I E N Q I R N
601 AACTTCCAGC AGCGGATCCG TCCGGCGAAC AACACCATTA GCCTGGAAAA CAAATGGGGC
   N F Q Q R I R P A N N T I S L E N K W G
661 AAAGTGGAGT TCCAGATTCG TACCAGCGGC GCGAACGGCA TGTTTCAGCGA AGCGGTGGAA
   K L S F Q I R T S G A N G M F S E A V E
721 CTGGAACGTG CGAACGGCAA AAAATATTAT GTGACCGCGG TGGATCAGGT GAAACCGAAA
   L E R A N G K K Y Y V T A V D Q V K P K
781 ATGCGCTGC TGAAATTCGT CGACAAAGAT CCGAAATAAT AA
   I A L L K F V D K D P K -

```

Abbildung 6.2: DNA- und AS-Sequenz von rGel im Expressionsvektor pET-Gel (Hossann, 2004)

6.3 Plasmidkarte von pET-Gel

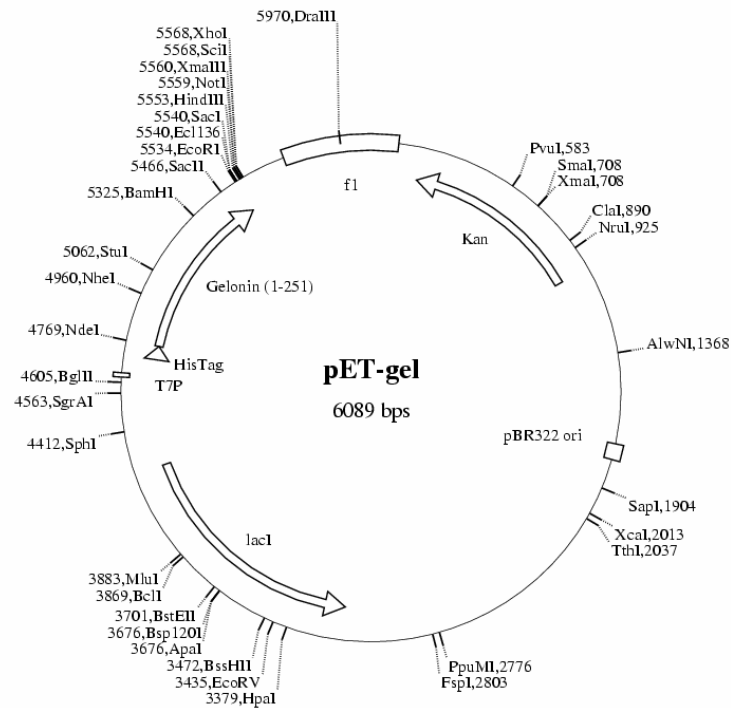


Abbildung 6.3: Plasmidkarte und Schnittstellen von pET-Gel (Hossann, 2004)

7. Literaturverzeichnis

- Agata Y., Kawasaki A., Nishimura H., Ishida Y., Tsubata T., Yagita H., Honjo T. (1996) Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol*, **8**, 765-772.
- Akerström B., Brodin K., Reis K., Björck L. (1985) Protein G: a powerful tool for binding and detection of monoclonal and polyclonal antibodies. *J Immunol*, **135**, 2589-2592.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2004) *Molekularbiologie der Zelle*. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 4. Auflage.
- Anderson J., Melchers F. (1978) The antibody repertoire of hybrid cell lines obtained by fusion of X63-AG8 myeloma cells with mitogen-activated B-cell blasts. *Curr Top Microbiol Immunol*, **81**, 130-139.
- Appli Chem Homepage: <http://www.applichem.com/shop/produktdetail/as/protein-marker-iii-65-200/>
- Badr M. (2012) *The ribosome-inactivating protein gelonin and parts thereof to be employed for a potential treatment of cancer*. Dissertation, Technische Universität Kaiserslautern.
- Barbieri L., Valbonesi P., Bonora E., Gorini P., Bolognesi A., Stirpe F. (1997) Polynucleotide: adenosine glycosidase activity of ribosome-inactivating proteins: effect on DNA, RNA and poly(A). *Nucleic Acids Res*, **25**, 518–522.
- Bazin R., Lemieux R. (1988) Effect of the elapsed time after the final antigen boost on the specificity of monoclonal antibodies produced by B-cell hybridomas. *J Immunol Meth*, **112**, 53-56.
- Bensadoun A., Weinstein D. (1976) Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal Biochem*, **70**, 241–250.
- Bessler W.G., Baron D. (1988) Die Herstellung und Anwendung monoklonaler Antikörper. *Naturwissenschaften*, **75**, 496-502.
- Bosch F., Rosich L. (2008) The contributions of Paul Ehrlich to pharmacology: a tribute on the occasion of the centenary of his nobel prize. *Pharmacology*, **82**, 171-179.

- Brock T.D., Madigan M.T., Martinko J.M. (2009) *Brock Mikrobiologie*, Pearson Studium Verlag, München, 11. Auflage.
- Brust S., Filipp G., Hofmann U., Kalies I., Peper K., Rajki K., Sterz R.K., Trommer W.E. (1987) Antigen-gelonin conjugates: preparation and application in *myasthenia gravis*. *Biol Chem Hoppe-Seyler*, **368**, 991–999.
- Burk S. (1990) *Versuche zur Herstellung eines Konjugates aus Dihydrolipoyl-Acetyltransferase und Gelonin*. Diplomarbeit, Technische Universität Kaiserslautern.
- Campbell N.A. (1997) *Biologie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, Oxford, 1. Auflage.
- Carlsson J., Drevin H., Axen R. (1978) Protein thiolation and reversible protein-protein conjugation. N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionate, a new heterobifunctional reagent. *Biochem J*, **173**, 723-737.
- Choudhary S., Mathew M., Verma R.S. (2011) Therapeutic potential of anticancer immunotoxins. *Drug Discovery Today*, **16**, 495-503.
- Clark D.P., Pazdernik N.J. (2009) *Molekulare Biotechnologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Corry R.J., Winn H.J., Russell P.S. (1973) Primarily vascularized allografts of hearts in mice. The role of H-2D, H-2K, and non-H-2 antigens in rejection. *Transplantation*, **16**, 343-350.
- Czihak G., Langer H., Ziegler H. (1996) *Biologie*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 6. Auflage.
- Daubenfeld T., Hossann M., Trommer W.E., Niedner-Schatteburg G. (2005) On the contentious sequenz and glycolysation motif of the ribosome inactivating plant protein Gelonin. *Biochem Biophys Res Commun*, **333**, 984-989.
- Del Rio M.L., Penuelas-Rivas G., Dominguez-Perles R., Ramirez P., Parrilla P., Rodriguez-Barbosa J.I. (2005) Antibody-mediated signaling through PD-1 costimulates T cells and enhances CD28-dependent proliferation. *Eur J Immunol*, **35**, 3545-3560.

- Del Rio M.L., Buhler L., Gibbons C., Tian J., Rodriguez-Barbosa J.I. (2008) PD-1/PD-L1, PD-1/PD-L2, and other co-inhibitory signaling pathways in transplantation. *Transpl Int*, **21**, 1015-1028.
- Descotes G., Romano M., Stirpe F., Spreafico F. (1985) The immunological activity of plant toxins used in the preparation of immunotoxins-II. The immunodepressive activity of gelonin. *Int J Immunopharmacol*, **7**, 455-463.
- Dübel S. (2007) *Handbook of Therapeutic Antibodies*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 1. Auflage.
- Ehrlich P. (1900) On immunity with special reference to cell life. *Proc R Soc Lond*, **66**, 424-448.
- Endo Y., Mitsui K., Motizuki M., Tsurugi K. (1987) The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. The site and the characteristics of the modification in 28S ribosomal RNA caused by the toxins. *J Biol Chem*, **262**, 5908–5912.
- Filipovich A.H., Vallera D., McGlave P., Polich D., Gajl-Peczalska K., Haake R., Lasky L., Blazar B., Ramsay N.K., Kersey J. (1990) T cell depletion with anti-CD5 immunotoxin in histocompatible bone marrow transplantation. The correlation between residual CD5 negative T cells and subsequent graft-versus-host disease. *Transplantation*, **50**, 410-415.
- Freund J. (1956) The mode of action of immunologic adjuvants. *Adv Tuberc Res*, **7**, 130-148.
- GE Healthcare (2009) Products for life sciences, Katalog.
- GE Healthcare (2012) ÄKTA™ Protein purification by design, Broschüre.
- Ghetie V., Thorpe P., Ghetie M.A., Knowles P., Uhr J.W., Vitetta E.S. (1991) The GLP large scale preparation of immunotoxins containing deglycosylated ricin A chain and a hindered disulfide bond. *Journal of Immunological Methods*, **142**, 223-230.
- Ghetie V., Vitetta E.S. (2001) Chemical construction of immunotoxins. *Mol Biotechnol*, **18**, 251-268.
- Goding J.M. (1986) *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*. Academic Press, Hrsg. Harcourt Brace Jovanovich, 2. Auflage.

- Gould D.S., Auchincloss H.Jr. (1999) Direct and indirect recognition: the role of MHC antigens in graft rejection. *Immunol Today*, **20**, 77-82.
- Grassetti D.R., Murray Jr. J.F. (1967) Determination of sulfhydryl groups with 2,2'- or 4,4'-Dithiodipyridine. *Arch Biochem Biophys*, **119**, 41-49.
- Grossbard M.L., Gribben J.G., Freedman A.S., Lambert J.M., Kinsella J., Rabinowe S.N., Eliseo L., Taylor J.A., Blattler W.A., Epstein C.L. (1993) Adjuvant immunotoxin therapy with anti-B4-blocked ricin after autologous bone marrow transplantation for patients with B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*, **81**, 2263-2271.
- Harlow E., Lane D. (1988) *Antibodies. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Herbert W.J. (1973) Mineral-oil adjuvants and the immunization of laboratory animals. *Handbook of Experimental Immunology*, D. M. Weir, ed., Vol. 3, Chapter 2, Blackwell, Oxford.
- Herbert W.J., Kristensen F. (1986) Laboratory animal techniques for immunology. In: Weir D.M., Herzenberg L.A., Blackwell C., Herzenberg L.A. (eds) *Handbook of Experimental Immunology: Applications of Immunological Methods in Biomedical Sciences*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 133.1-133.36.
- Ho S.F., Clipstone N., Timmermann L., Northrup J., Graef I., Fiorentio D., Nourse J., Crabtree G.R. (1996) The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Clin Immunol Immunopathol*, **80**, S40-S45.
- Hofmann U. (1988) *Untersuchungen zum Mechanismus der Antigen-spezifischen Immunsuppression mit Hilfe von Antigen-Toxin-Konjugaten*. Dissertation, Technische Universität Kaiserslautern.
- Hossann M. (2004) *Antigen-spezifische Immunsuppression in einem Tiermodell der Myasthenia gravis*. Dissertation, Technische Universität Kaiserslautern.

- Hossann M., Li Z.-Y., Shi Y., Kreilinger U., Büttner J., Vogel P.D., Yuan J., Wise J.G., Trommer W.E. (2006) Novel immunotoxin: A fusion protein consisting of gelonin and an acetylcholine receptor fragment as a potential immunotherapeutic agent for the treatment of *Myasthenia gravis*. *Protein Expression and Purification*, **46**, 73-84.
- Huang P., Chen H.C., Kung H.F., Huang R., Huang R., Huang P., Huang H., Lee Huang S. (1992) Anti-HIV plant proteins catalyze topological changes of DNA into inactive forms. *Biofactors*, **4**, 37-41.
- Hunter M.J., Ludwig M.L. (1972) Amidination. *Methods in Enzymology*, **25**, 585-596.
- Ishida Y., Agata Y., Shibahara K., Honjo T. (1992) Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J*, **11**, 3887-3895.
- Ishikawa E., Imagawa M., Hashida S., Yoshitake S., Hamaguchi Y., Ueno T. (1983) Enzyme-labeling of antibodies and their fragments for enzyme immunoassay and immunohistochemical staining. *Journal of Immunoassay*, **4**, 209-327.
- Jackson R., Campbell E.A., Herbert P., Hunt T. (1983) The preparation and properties of gel-filtered rabbit-reticulocyte lysate protein-synthesis systems. *Eur J Biochem*, **131**, 289-301.
- Janeway C.A., Travers P., Walport M., Murphy K. (2009) *Janeway Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, 7. Auflage.
- Jerne N.K. (1985) Die generative Grammatik des Immunsystems (Nobel-Vortrag). *Angew. Chem.*, **97**, 813-818.
- Jue R., Lambert J.M., Pierce L.R., Traut R.R. (1978) Addition of sulfhydryl groups of *Escherichia coli* ribosomes by protein modification with 2-iminothiolane (methyl 4-mercaptobutyrimidate). *Biochemistry*, **17**, 5399-5406.
- Keir M.E., Butte M.J., Freeman G.J., Sharpe A.H. (2008) PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*, **26**, 677-704.
- Klinke R., Silbernagel S. (1996) *Lehrbuch der Physiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2. Auflage.

- Koolman J., Röhm K.-H. (2009) *Taschenatlas Biochemie des Menschen*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 4. Auflage.
- Köhler G. (1985) Herstellung und Diversifizierung von monoklonalen Antikörpern (Nobel-Vortrag). *Angew Chem*, **97**, 829–836.
- Köhler G., Milstein C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, **256**, 495-497.
- Kreilinger U. (2001) *Versuche zur antigenspezifischen Immunsuppression der Myasthenia gravis mit Immuntoxinen aus Gelonin und rekombinanten AChR-Fragmenten*. Dissertation, Technische Universität Kaiserslautern.
- Kreitman R.J. (2006) Immunotoxins for targeted cancer therapy. *The AAPS Journal*, **8**, E532-E551.
- Kreitman R.J. (2009) Recombinant immunotoxins containing truncated bacterial toxins for the treatment of hematologic malignancies. *BioDrugs*, **23**, 1-13.
- Layne E. (1957) Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. *Methods Enzymol*, **3**, 447-454.
- Laemmli U. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680–685.
- Leads R., Tommerup H., Svendsen I., Mundy J. (1991) Biochemical and molecular characterization of three barley seed proteins with anti-fungal properties. *J Biol Chem*, **266**, 1564–1573.
- Li Z.-Y. (2002) *Immuntoxins and neurotrophins: Novel strategies for the efficient expression of recombinant proteins*. Dissertation, Technische Universität Kaiserslautern.
- Liddell E., Weeks I. (1996) *Antikörper-Techniken*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, Oxford, 1. Auflage.
- Lord J.M., Roberts L.M. (1998) Retrograde transport: Going against the flow. *Curr Biol*, **8**, 56-58.

- Martin P.J., Pei J., Gooley T., Anasetti C., Appelbaum F.R., Deeg J., Hansen J.A., Nash R. A., Petersdorf E.W., Storb R., Ghetie V., Schindler J., Vitetta E.S. (2004) Evaluation of a CD25-specific immunotoxin for prevention of graft-versus-host disease after unrelated marrow transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, **10**, 552-560.
- Matzinger P., Bevan M.J. (1977) Hypothesis: why do so many lymphocytes respond to major histocompatibility antigens? *Cell Immunol*, **29**, 1-5.
- Milstein C., Borges J.L. (1985) Von der Antikörperstruktur zur Diversität der Immunantwort (Nobel-Vortrag). *Angew Chem*, **97**, 819-828.
- Moldenhauer G. (2007) *Hauptpraktikum Cellular Immunology, Production of monoclonal antibodies*. Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg.
- Naturwissenschaften (1980) *Gelonin ein inkomplettes Phytotoxin*, **67**, 601.
- Nolan P.A., Garrison D.A., Better M. (1993) Cloning and expression of a gene encoding gelonin, a ribosome-inactivating protein from *Gelonium multiflorum*. *Gene*, **134**, 223–227.
- Pastan I., Willingham M.C., FitzGerald D.J. (1986) Immunotoxins. *Cell*, **47**, 641-648.
- Pastan I., Hassan R., FitzGerald D.J., Kreitman R.J. (2006) Immunotoxin therapy of cancer. *Nature Reviews Cancer*, **6**, 559-565.
- Pastan I., Hassan R., FitzGerald D.J., Kreitman R.J. (2007) Immunotoxin treatment of cancer. *Annu Rev Med*, **58**, 221-237.
- Pelham H.R., Jackson R.J. (1976) An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur J Biochem*, **67**, 247–256.
- Peters J., Baumgarten H. (1990) *Monoklonale Antikörper: Herstellung und Charakterisierung*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 2. Auflage.
- Peterson G. (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal Biochem*, **83**, 346–356.
- Peterson G.L. (1983) Determination of total protein. *Methods Enzymol*, **91**, 95-119.

- Pirie C.M., Hackel B.J., Rosenblum M.G., Wittrup K.D. (2011) Convergent potency of internalized gelonin immunotoxins across varied cell lines, antigens, and targeting moieties. *J Biol Chem*, **286**, 4165-4172.
- Rosenblum M.G., Kohr W.A., Beattie W.G., Marks W., Toman P.D., Cheung L. (1995) Amino acid sequence analysis, gene construction, cloning and expression of gelonin, a toxin derived from *Gelonium multiflorum*. *J Interferone Cytokine Res*, **15**, 547-555.
- Rousselle H.-P. (1996) *Immunotoxine aus Fragmenten des humanen nicotinischen Acetylcholinrezeptors und dem Pflanzentoxin Gelonin*. Dissertation, Technische Universität Kaiserslautern.
- Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2. Auflage.
- Sambrook J., Russell D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Vol. 3*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3. Auflage.
- Schanz S. (2009) *Versuche zur Kopplung von Gelonin an einen monoklonalen anti-PD1-Antikörper und immunologischer Nachweis des Konjugates nach der Isolierung*. Diplomarbeit, Technische Universität Kaiserslautern.
- Schäfer F. (1990) *Darstellung eines Antikörper-Gelonin-Konjugates*, Diplomarbeit, Technische Universität Kaiserslautern.
- Schäfer F. (1995) *Versuche zur antigenspezifischen Immunsuppression mit Antigen-Toxin-Konjugaten*. Dissertation, Technische Universität Kaiserslautern.
- Smith, B.J. (1984) SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins, in *Methods in Molecular Biology, vol. 1: Proteins*. (Walker, J. M., ed.), Humana, Clifton, NJ, 41–55.
- Smith P., Krohn R., Hermanson G., Mallia A., Gartner F., Provenzano M., Fujimoto E., Goeke N., Olson B., Klenk D. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analyt Biochem*, **150**, 76–85.
- Stirpe F., Battelli M.G. (2006) Ribosome-inactivating proteins: progress and problems. *Cell Mol Life Sci*, **63**, 1850-1866.

- Stirpe F., Olsnes S., Phil A. (1980) Gelonin, a new inhibitor of protein synthesis, nontoxic to intact cells. *J Biol Chem*, **255**, 6947–6953.
- Stryer L., Berg J.M., Tymoczko J.L. (2007) *Stryer Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag, Elsevier GmbH, Heidelberg, 6. Auflage.
- Süßmuth R., Eberspächer J., Haag R., Springer W. (1997) *Biochemisch-mikrobiologisches Praktikum*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1. Auflage.
- Thorpe P.E., Brown A.N., Ross W.C., Cumber A.J., Detre S.I., Edwards D.C., Davies A.J., Stirpe F. (1981) Cytotoxicity acquired by conjugation of an anti-Thy1.1 monoclonal antibody and the ribosome-inactivating protein, gelonin. *Eur J Biochem*, **116**, 447-454.
- Trommer W.E. (2009) *Biochemisches Praktikum*. Technische Universität Kaiserslautern.
- Urbatsch I.L., Sterz R.K., Peper K., Trommer W.E. (1993) Antigen-specific therapy of experimental *myasthenia gravis* with acetylcholine receptor-gelonin conjugates *in vivo*. *Eur J Immunol*, **23**, 776–779.
- Vitetta E.S., Thorpe P. (1991) Immunotoxins. in: De Vita V.T., Hellman S., Rosenberg S.A. (Hersg.). *Biological therapy of cancer*, J. P. Lippincott Company, Philadelphia, 482-495.
- Weston P.D., Deviers J.A., Wrigglesworth R. (1980) Conjugation of enzymes to immunoglobins using dimaleimides. *Biochem Biophys Acta*, **612**, 40-49.
- Walsh T.A., Morgan A.E., Hey T.D. (1991) Characterization and molecular cloning of a proenzyme form of a ribosome-inactivating protein from maize. *J Biol Chem*, **266**, 23422-23427.
- Yoshitake S., Hamaguchi Y., Ishikawa E. (1979) Efficient conjugation of rabbit F_{ab}' with β -D-galactosidase from *Escherichia coli*. *Scand J Immunol*, **10**, 81-86.
- Zimmermann J., (1990) *Monoklonale Antikörper gegen Gelonin: Herstellung, Charakterisierung und Anwendung*. Dissertation, Technische Universität Kaiserslautern.
- Zimmermann J., Trommer W.E. (1991) Monoclonal antibodies to gelonin: Production and characterization. *Hybridoma*, **10**, 65-76.

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle ganz herzlich bei allen bedanken die zum Gelingen meiner Dissertation beigetragen haben.

- Mein ganz besonderer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. Wolfgang E. Trommer für die Überlassung des Arbeitsplatzes, die Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die Vergabe des interessanten Themas meiner Dissertation. Für seine ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft, Unterstützung und Motivation.
- Herrn PD Dr. Gerd Klock für die Übernahme des Zweitgutachtens meiner Dissertation.
- Herrn Prof. Dr. Helmut Sitzmann für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.
- Mein weiterer Dank gilt Herrn Dr. Jose-Ignacio Rodriguez-Barbosa vom Institut für Biomedizin in León (Spanien) für seine Kooperation und die Bereitstellung des anti-PD-1-Antikörpers, sowie für seine Betreuung und die schöne Zeit während meines Aufenthaltes in seiner Arbeitsgruppe.
- Ich danke Herrn Dr. Reinhard Philipp für sein offenes Ohr bei allen Problemen, seine Hilfsbereitschaft und seine Verbesserungsvorschläge beim Korrekturlesen meiner Dissertation.
- Frau Elke Litmianski möchte ich danken für ihre Hilfsbereitschaft bei allen Problemen und für die tollen Gespräche während unserer Mittagspausen.
- Frau Doreen Knochenhauer danke ich für ihre Hilfe bei zahlreichen Geloninisolierungen und ELISAs, eine gute Zusammenarbeit und viele schöne Gespräche.
- Bei Herrn Dipl. Chem. Christian Kopp bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit, sowie für seine Hilfsbereitschaft bei allen Problemen.
- Bei allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Trommer bedanke ich mich ganz herzlich für die gute Zusammenarbeit, die schöne Zeit im Labor, im Kaffeezimmer und für alle anderen lustigen Dinge und Feiern. Ich werde die Zeit mit euch nie vergessen.
- Ich danke allen meinen Diplomanden (Stefanie Schanz, Maximilian Stutz und Kathrin Stegmaier), Forschungspraktikanten (Tania Thill und Annika Frank) und Bachelorarbeitskandidaten (Laura Zagarinkas). Die Betreuung eurer Arbeiten hat mir sehr viel Spaß gemacht und hat meine Arbeit bereichert.

- Bedanken möchte ich mich bei Frau Maren Stavermann und Herrn Dr. Mark Pottek (Arbeitsgruppe Deitmer, Fachbereich Biologie, Technische Universität Kaiserslautern) für ihre Hilfe bei der Mäusebestellung und der Tierversuchsplanung.
- Bei den Tierhausmitarbeitern bedanke ich mich für ihre Hilfe und Unterstützung beim Versorgen, Immunisieren, der Blutprobenentnahme und der Tötung meiner Mäuse.
- Herrn Dr. Gerhard Moldenhauer vom DKFZ in Heidelberg danke ich für seine Einführung in die Antikörperherstellung und seine hilfreichen Tipps.
- Prof. Dr. Johannes Hermann und seinen Mitarbeitern (Fachbereich Biologie, Technische Universität Kaiserslautern), sowie Jun. Prof. Dr. Sandro Keller und seinen Mitarbeitern danke ich für die Bereitstellung der ÄKTA und die Hilfe bei den Messungen.
- Von ganzen Herzen danke ich meinem Mann Sven und meiner Familie für die Unterstützung während meiner Dissertation. Danke, dass ihr immer für mich da wart, ohne euch wäre alles nicht möglich gewesen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Jessica Becker

Promotion

23.05.2013 Tag der wissenschaftlichen Aussprache
03/2009-04/2013 Promotion in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wolfgang E. Trommer, Fachbereich Chemie, Fachrichtung Biochemie, Technische Universität Kaiserslautern
Thema: Herstellung eines anti-PD-1-Gelonin-Konjugats zum Einsatz in der Transplantationsmedizin
03/2012-05/2012 Auslandsaufenthalt am Institut für Biomedizin (IBIOMED), Fachrichtung Immunologie, León, Spanien

Studium

18.02.2009 Diplomhauptprüfung in Chemie
Abschluss: Diplom-Chemikerin
08/2008-02/2009 Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wolfgang E. Trommer, Fachbereich Chemie, Fachrichtung Biochemie, Technische Universität Kaiserslautern
Thema: Versuche zur Herstellung eines neuen Acetylcholinrezeptor Gelonin-Konjugats und Untersuchungen zum Wirkmechanismus von Daptomycin
03/2007-05/2007 ERASMUS-Auslandsaufenthalt, Universität von Burgund, UMR INSERM U866, Dijon, Frankreich
Forschungsarbeit: Antiproliferative effect of resveratrol and some of its derivatives: uptake and cell cycle regulation in cancer cell lines
04.08.2006 Diplomvorprüfung in Chemie
10/2003 Beginn des Chemiestudiums an der Technischen Universität Kaiserslautern

Schulbildung

26.06.2003	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
2000-2003	Berufliches Gymnasium, Bildungsgang Technik, Fachrichtung Umwelttechnik Idar-Oberstein
1994-2000	Realschule Idar-Oberstein
1990-1994	Grundschule Niederbrombach

Stipendium

03/2009-12/2012	Stipendiatin der Technischen Universität Kaiserslautern
-----------------	---

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

„Herstellung eines anti-PD-1-Gelonin-Konjugats zum Einsatz in der Transplantationsmedizin“

selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe und diese Arbeit in gleicher oder abgewandelter Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegt wurde.

Kaiserslautern, den 04.04.2013

Jessica Becker