

# **Bifunktionelle artifizielle Immunkonjugate zur Eliminierung von Krebszellen**

## **Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
*doctor rerum naturalium* (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der  
Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
Biowissenschaften  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg



von

**Sabine Bergelt**

geboren am 31. Oktober 1981 in Annaberg-Buchholz

Gutachter:

1. Dr. habil. Hauke Lilie, MLU Halle-Wittenberg
2. Dr. habil. Ulrich Brinkmann, Roche Penzberg
3. Prof. Dr. Roland Kontermann, Universität Stuttgart

Tag der öffentlichen Verteidigung: 10. September 2010



# Zusammenfassung

Die Krankheit Krebs stellt eine der häufigsten Erkrankungen weltweit dar. Viele der bis heute verwendeten Therapien sind verbunden mit starken Nebenwirkungen oder sind ineffizient in der Eliminierung von Krebszellen. Somit stellen die Verbesserung der Wirksamkeit und die Verminderung von Nebenwirkungen wichtige Ziele bei der Entwicklung neuer bzw. Verbesserung bestehender Behandlungsmöglichkeiten dar.

So wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei artifizielle bifunktionelle Immunkonjugate zur Eliminierung von Krebszellen entwickelt und funktionell charakterisiert. Die modularen Proteinkomplexe bestanden aus dem zellbindenden Antikörperfragment B3 und je einem funktionellen Protein; einem Proteintoxin (Listeriolysin O) und einem Immunliganden (MICA). Im Kontext der Entwicklung potenziell in der Krebstherapie einsetzbarer bispezifischer Proteinkonstrukte sollten zwei unterschiedliche Strategien verfolgt werden. Das Proteintoxin Listeriolysin O (LLO) wirkte unmittelbar zytotoxisch auf Zellen, wohingegen durch den Immunliganden MICA die simultane Bindung und Aktivierung Natürlicher Killerzellen vermittelt werden sollte. Beide Proteine sollten durch das gekoppelte tumorspezifische Antikörperfragment gezielt an Tumorzellen adressiert werden, was letztlich zur Protein-vermittelten bzw. Zell-vermittelten Lyse der Tumorzellen führen sollte. Die Verknüpfung der jeweiligen Komponenten zu einem bifunktionellen Proteinkonstrukt wurde mittels eines hoch spezifischen Heterodimerisierungsmotives gewährleistet, welches aus entgegengesetzt geladenen polyionischen Fusionspeptiden ( $R_8C$  und  $E_8C$ ) besteht, die ein zusätzliches Cystein enthalten. Die Fusionspeptide interagieren über elektrostatische Wechselwirkungen miteinander und durch die Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen werden die Proteine kovalent zu einem bifunktionellen Konstrukt verknüpft. Für beide modularen Konstrukte konnten auf diese Weise hohe Ausbeuten an homogen verknüpftem Heterodimer erhalten werden.

Die Verknüpfung des tumorspezifischen Antikörperfragmentes mit polyionischem LLO führte zum Immuntoxin B3-LLO. Für das polyionische Antikörperfragment konnte eine spezifische Bindung an sein Antigen Lewis Y auf Tumorzellen nachgewiesen werden. Auch im Kontext des Immuntoxins konnte die biologische Aktivität, also die Bindung Lewis Y-positiver Zellen, gezeigt werden. Bei dem Proteintoxin LLO handelt es sich um ein Zytolysin, welches die Fähigkeit besitzt, mit cholesterinhaltigen Membranen zu interagieren. Monomere des Proteins bilden dabei ringförmige Poren nach der Bindung an die Membran, was letztlich zur Zellyse führt. Der Nachweis der biologischen Aktivität erfolgte mittels Hämolyseexperimenten, bei denen die Membran nativer Erythrozyten durch das Protein zerstört wird. Für die polyionische Variante des LLO konnte dabei kein Aktivitätsverlust gegenüber dem Wildtyp-Protein beobachtet werden, was zeigte, dass die N-terminale polyionische Fusion  $E_8C$  keinen Einfluss auf die Aktivität des Proteins hat. Da LLO direkt mit Zellen interagieren kann, musste gewährleistet werden, dass das Immuntoxin B3-LLO nicht über LLO sondern über das Antikörperfragment spezifisch an Zellen bindet. Dies konnte über fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nachgewiesen werden. Die biologische Aktivität des Immuntoxins wurde durch die Inkubation mit verschiedenen Lewis Y-negativen sowie -positiven Zelllinien untersucht. Zum Vergleich der Aktivität wurden die Zellen außerdem mit den isolierten Toxinen, oxidiertem und reduziertem polyionischem LLO, inkubiert. Die Oxidation der Thiolgruppe des singulären Cysteins des LLO führt dabei zu einem Verlust an lytischer Aktivität. Dies konnte sowohl mittels der Hämolyseexperimente als auch in den Zellkulturexperimenten bestätigt werden.

Durch die Kopplung des tumorspezifischen Antikörperfragmentes an LLO mittels polyionischer Fusionspeptide konnte ein Zelltyp-spezifisches, biologisch aktives und sehr wirksames Immuntoxin hergestellt werden.

Während LLO direkt zytotoxisch auf Zellen wirkt, sollte das bifunktionelle Konstrukt B3-MICA über den Immunliganden MICA Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) zu Tumorzellen rekrutieren und simultan aktivieren. Die Aktivierung der Zellen sollte dabei über die Bindung des Immunliganden an einen aktivierenden Rezeptor auf NK-Zellen (NKG2D) erfolgen. Die gleichzeitige Bindung des B3-MICA an Tumorzellen, vermittelt über das Antikörperfragment, sollte schließlich zur NK-Zell-vermittelten Lyse der Krebszellen führen. Zunächst wurden das Protein MICA und die polyionische Variante (MICA-E<sub>8</sub>C) hergestellt und biophysikalisch charakterisiert. Dabei zeigte sich, dass die polyionische Variante weniger stabil gegenüber thermisch induzierter Denaturierung war als das Wildtyp-Protein. Dieser Stabilitätsverlust, möglicherweise durch die polyionische Fusion hervorgerufen, führte jedoch nicht zu einem Verlust an struktureller Integrität des Proteins im Vergleich mit dem Wildtyp-Protein. Die Funktionalität des polyionischen Immunliganden, die Bindung der extrazellulären Domäne des Rezeptors NKG2D, wurde ebenfalls durch die polyionische Fusion nicht beeinträchtigt, was *in vitro* Bindungsstudien zeigen konnten. Eine spezifische Bindung des Proteins an den Rezeptor auf NK-Zellen konnte jedoch nicht eindeutig nachgewiesen werden. Durch die Kopplung des Immunliganden mit dem Antikörperfragment über die polyionischen Fusionspeptide wurde das modulare Immunkonjugat B3-MICA generiert. Dessen biologische Wirkung wurde anhand von Zellkulturexperimenten zunächst mit einer Lewis Y-positiven sowie -negativen Zelllinie untersucht. Überraschenderweise zeigte sich ein zytotoxischer Effekt des B3-MICA für die Antigen-positive Zelllinie MCF7. Dieser zytotoxische Effekt wurde nicht allein durch die Bindung des B3-MICA an das Antigen hervorgerufen, sondern war abhängig von der Internalisierung des bifunktionellen Proteins in Zielzellen. Damit fungierte das Immunkonjugat B3-MICA als Immuntoxin. Die Untersuchung der Aktivität des Konjugates im Kontext mit NK-Zellen zeigte lediglich den *per se* toxischen Effekt des bifunktionellen Proteins. Aufgrund dessen wurden die NK-Zellen (Zelllinie NK92 MI) hinsichtlich ihrer inhärenten zytotoxischen Aktivität analysiert. Es zeigte sich, dass die Zellen in der Lage waren, andere Zelllinien, insbesondere die NK-sensitive Zelllinie K-562, aber auch die in dieser Arbeit großteils verwendete Zelllinie MCF7, zu töten. Somit kann die ausgebliebene biologische Wirkung des B3-MICA, die Rekrutierung und Aktivierung von NK-Zellen, vermutlich auf die geringe thermische Stabilität des polyionischen MICA und damit mangelnde spezifische Bindung an NK-Zellen zurückgeführt werden. Es bleibt somit festzuhalten, dass mit dem Immunkonjugat B3-MICA ein wirksames Immuntoxin geschaffen werden konnte, das Konjugat jedoch nicht in der Lage war, NK-Zellen zu rekrutieren und simultan zu aktivieren.

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>5</b>
1.1	Krebs und Krebstherapie	5
1.2	Monoklonale Antikörper in der Krebstherapie	7
1.3	Immunkonjugate	9
1.3.1	Immuntoxine	11
1.3.1.1	Listeriolysin O	14
1.3.1.2	B3-Antikörperfragment	17
1.3.2	Aktivierung des Immunsystems	18
1.3.2.1	Natürliche Killerzellen	20
1.3.2.2	Der aktivierende Rezeptor NKG2D und sein Ligand MICA	23
1.4	Problemstellung und Ziele	24
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>26</b>
2.1	Chemikalien	26
2.2	Enzyme, Reagenzien und Standards	28
2.3	Antikörper	28
2.4	sonstige Materialien	29
2.5	Geräte und Zubehör	30
2.6	Bakterien und Plasmide	33
2.7	Oligonukleotide	34
2.8	Zusammensetzung häufig verwendeter Puffer und Lösungen	34
2.9	Medien und Lösungen für die Kultivierung von Mikroorganismen	36
2.10	Materialien für die Zellkultur	37
2.11	Software	40
2.12	Molekularbiologische Methoden	40
2.12.1	Isolierung von Plasmid-DNA	40
2.12.2	Agarosegelelektrophorese	41
2.12.3	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	41
2.12.4	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	41
2.12.5	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	42
2.12.6	TOPO-Klonierung	43
2.12.7	Ligation von DNA-Fragmenten	43
2.12.8	Sequenzierung und Synthese von Oligonukleotiden	44
2.12.9	Konstruktion der Expressionsvektoren	44
2.12.10	Stammhaltung und Kultivierung von Mikroorganismen	45
2.12.10.1	Stammhaltung und Anzucht von Mikroorganismen	45
2.12.10.2	Herstellung elektrokompenter Zellen zur Elektroporation	45

2.12.10.3	Herstellung chemokompetenter Zellen .....	45
2.12.10.4	Transformation von Mikroorganismen .....	45
2.12.10.5	Expression im Schüttelkolben .....	46
2.12.10.6	Expression durch Kultivierung im Bioreaktor .....	47
<b>2.13</b>	<b>Proteinchemische und analytische Methoden .....</b>	<b>47</b>
2.13.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	47
2.13.2	Western Blot.....	48
2.13.3	Proteinisolierung und -reinigung .....	48
2.13.3.1	Herstellung des Rohextraktes von löslichem GST-E <sub>8</sub> C-LLO .....	48
2.13.3.2	Isolierung von <i>inclusion bodies</i> .....	48
2.13.3.3	Solubilisierung von <i>inclusion bodies</i> .....	49
2.13.3.4	Renaturierung des B3-Antikörperfragmentes .....	50
2.13.3.5	Renaturierung von MICA und MICA-E <sub>8</sub> C .....	50
2.13.3.6	Renaturierung von NKG2D .....	51
2.13.3.7	Chromatographische Methoden.....	51
2.13.3.8	Reinigung und proteolytische Spaltung von GST-E <sub>8</sub> C-LLO .....	53
2.13.3.9	Reinigung des B3-Antikörperfragmentes .....	53
2.13.3.10	Reinigung von MICA .....	54
2.13.3.11	Reinigung von MICA-E <sub>8</sub> C.....	54
2.13.3.12	Reinigung von NKG2D .....	54
2.13.3.13	Kopplung und Reinigung von B3-LLO .....	55
2.13.3.14	Kopplung und Reinigung von B3-MICA .....	55
2.13.4	Proteinbestimmung nach Bradford.....	55
2.13.5	Konzentrierung von Proteinlösungen .....	56
2.13.6	Modifikation von Proteinen mit GSSG .....	56
2.13.7	Bestimmung freier SH-Gruppen.....	56
2.13.8	Analytische Ultrazentrifugation .....	56
2.13.9	Massenspektrometrie .....	57
2.13.10	Markierung von Proteinen mit Fluoreszenzfarbstoffen .....	57
2.13.11	Stabilität von Proteinen gegenüber Proteasen im Serum.....	58
2.13.12	Bestimmung der hämolytischen Aktivität von LLO-Varianten und LLO-Konjugaten .....	58
<b>2.14</b>	<b>Spektroskopische Methoden.....</b>	<b>59</b>
2.14.1	UV/VIS-Spektroskopie.....	59
2.14.2	Fluoreszenzspektroskopie.....	60
2.14.3	CD-Spektroskopie .....	60
<b>2.15</b>	<b>Zellbiologische Methoden .....</b>	<b>62</b>
2.15.1	Kultivierung eukaryontischer Zellen .....	62
2.15.2	Passagierung eukaryontischer Zellen .....	62
2.15.3	Präparation einer Kryokultur .....	62
2.15.4	Reaktivierung einer Kryokultur.....	63
2.15.5	Fluoreszenzmikroskopie .....	63
2.15.5.1	Anfertigung von Dauerpräparaten .....	63
2.15.5.2	Mikroskopische Analyse lebender Zellen.....	64
2.15.6	Analyse der IFN $\gamma$ -Produktion von NK92-Zellen.....	64
2.15.7	Durchflusszytometrie .....	65

2.15.7.1	Bindung fluoreszenzmarkierter Proteine an Zellen .....	65
2.15.7.2	Zytotoxizitätsstudien .....	67
2.15.7.3	Gemischter Zellkulturassay .....	68
2.15.7.4	Bestimmung des EC <sub>50</sub> -Wertes .....	69
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>70</b>
<b>3.1</b>	<b>Das Immuntoxin B3-LLO.....</b>	<b>70</b>
3.1.1	Herstellung und Reinigung von B3-R <sub>8</sub> CP .....	71
3.1.2	Zelltypspezifität von B3-R <sub>8</sub> CP .....	71
3.1.3	Expression und Reinigung von E <sub>8</sub> C-LLO .....	73
3.1.4	Herstellung des Immuntoxins B3-LLO .....	74
3.1.5	Untersuchungen zur Sekundärstruktur des Immuntoxins .....	76
3.1.6	Hämolytische Aktivität von LLO-Varianten .....	77
3.1.7	Untersuchung der Stabilität von B3-LLO im Serum .....	79
3.1.8	Zellbindung des Immuntoxins .....	79
3.1.9	Zytotoxizität des Immuntoxins B3-LLO .....	81
3.1.10	Zusammenfassung.....	83
<b>3.2</b>	<b>Das Immunkonjugat B3-MICA .....</b>	<b>85</b>
3.2.1	Herstellung und Reinigung von MICA.....	86
3.2.2	Expression und Reinigung von MICA-E <sub>8</sub> C.....	87
3.2.3	Charakterisierung der MICA-Varianten .....	88
3.2.3.1	HPLC-Analyse der Proteine .....	88
3.2.3.2	CD-spektroskopische Untersuchungen der MICA-Varianten.....	89
3.2.3.3	Thermische Stabilität der MICA-Varianten.....	90
3.2.4	Herstellung und Reinigung von NKG2D.....	92
3.2.5	Funktionalitätsstudien zu MICA-E <sub>8</sub> C.....	94
3.2.5.1	Fluoreszenzspektroskopische Untersuchung .....	94
3.2.5.2	Analytische Gelfiltration.....	95
3.2.5.3	Analytische Ultrazentrifugation.....	95
3.2.5.4	Bindung des MICA-E <sub>8</sub> C an NK-Zellen .....	96
3.2.6	Herstellung des Immunkonjugates B3-MICA .....	98
3.2.7	Untersuchungen zur Sekundärstruktur von B3-MICA .....	100
3.2.8	Untersuchung der Stabilität des B3-MICA im Serum .....	101
3.2.9	Analyse der MICA-Expression von Tumorzelllinien .....	102
3.2.10	Charakterisierung der NK92-Zellen.....	103
3.2.11	Aktivität von B3-MICA in der Zellkultur .....	105
3.2.11.1	Zytotoxizität von B3-MICA .....	106
3.2.11.2	B3-MICA im Kontext mit NK-Zellen .....	107
3.2.12	Aktivität der NK92-Zellen .....	109
3.2.12.1	IFN $\gamma$ -Produktion der NK92-Zellen .....	109
3.2.12.2	Produktion von Chemokinen durch NK92-Zellen.....	111
3.2.12.3	Zytotoxizität der NK92-Zellen .....	112
3.2.13	Zusammenfassung.....	115
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>116</b>
<b>4.1</b>	<b>Das Immuntoxin B3-LLO.....</b>	<b>116</b>

<b>4.2</b>	<b>Das Immunkonjugat B3-MICA.....</b>	<b>122</b>
4.2.1	Charakterisierung MICA-E <sub>8</sub> C.....	122
4.2.2	Kopplung von B3-MICA.....	124
4.2.3	Aktivität des B3-MICA in der Zellkultur .....	125
<b>5</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>128</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>129</b>
<b>7</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>149</b>
7.1	Konstruktion der Expressionsvektoren.....	149
7.2	Biophysikalische Daten verwendeter Proteine.....	151
7.3	Sequenzen .....	151
7.4	Abkürzungsverzeichnis und englische Begriffe .....	156

---

# 1 Einleitung

## 1.1 Krebs und Krebstherapie

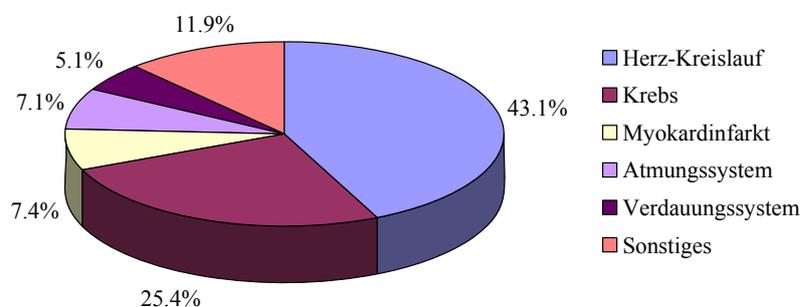
Bei einer der am weitesten verbreiteten Krankheiten weltweit handelt es sich um Krebs. Etwa einer von drei Menschen in den Industrienationen wird während seiner Lebenszeit mit der Diagnose Krebs konfrontiert werden (Rheingold *et al.*, 2003). So erkrankten im Jahre 2008 weltweit mehr als 12 Millionen Menschen an dieser oftmals tödlich verlaufenden Krankheit (WCR, *World Cancer Report*, 2008). Allein in Deutschland war Krebs im Jahre 2008 die zweithäufigste Todesursache nach Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems (Abbildung 1.1).

Bei Krebs handelt es sich um einen Sammelbegriff für bösartige Tumoren, deren Kennzeichen eine unkontrollierte Zellteilung und somit Zerstörung gesunden Gewebes sind. Es sind mittlerweile mehr als 100 Krebsarten bekannt, wobei prinzipiell jedes Organ betroffen sein kann. Es gibt,

eingeteilt nach ihrer Entstehung in unterschiedlichen Gewebetypen, zwei Arten bösartiger Tumoren; Karzinome (Epithelgewebe) und Sarkome (mesenchymales Stütz- und Bindegewebe).

Darüber hinaus kann man unterteilen in solide Tumoren (Krebserkrankungen der Organe, also Karzinome und Sarkome) und hämatologische Tumoren (Lymphome und Leukämien), welche aus entarteten Zellen des blutbildenden Knochenmarks entstehen. Losgelöste Zellen eines Primärtumors können über die Blut- und Lymphgefäße im Körper verteilt werden, sich im Gewebe ansiedeln und Tochtergeschwülste (Metastasen) bilden.

Eine der Ursachen für Krebs liegt in der Veränderung des Erbgutes von Körperzellen, die zur Fehlsteuerung des Wachstums führt. So können beispielsweise die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (die kodierten Proteine sind z. B. an der Regulation des Zellzyklus oder der Induktion der Apoptose beteiligt) oder aber die Aktivierung von Onkogenen durch Mutationen Krebserkrankungen auslösen. Solche Mutationen können durch unterschiedliche Faktoren, wie eine genetische Prädisposition, Virusinfektionen oder Umweltfaktoren ausgelöst werden (Frei *et al.*, 2003). Eine Krebszelle kann auch dann entstehen, wenn eine gesunde Zelle eine epigenetische Veränderung erfährt, d.h. wenn sich das Muster der Genexpression ändert, nicht jedoch die Gensequenz. Die Folge können Störungen in wichtigen Zellfunktionen sein, so z. B. die Kontrolle über Zelldifferenzierung und Apoptose (Hajra & Liu, 2004). In der Regel müssen jedoch mehrere Faktoren, innere und äußere,



**Abbildung 1.1:** Todesursachen in Deutschland im Jahre 2008. Mit 43.1 % stellen Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems die häufigste Todesursache dar, gefolgt von Krebs (25.4 %), dem Herzinfarkt (7.4 %) und Erkrankungen des Atmungs- (7.1 %) bzw. Verdauungssystems (5.1 %). Quelle: Bundesamt für Statistik, Stand 2008.

zusammenwirken, um aus einer gesunden Zelle eine Krebszelle entstehen zu lassen. Zu den äußeren Faktoren sind vor allem Strahlung, chemische Einflüsse, Viren und Lebensgewohnheiten zu zählen. Bei einer frühzeitigen Erkennung der Krebserkrankung stehen die Heilungschancen gut. Die klassischen Therapien, also Chemotherapie, Strahlentherapie und der chirurgische Eingriff, stellen trotz neuer Therapieformen den Hauptanteil bei der Krebsbehandlung dar. Bei einem chirurgisch-operativen Eingriff wird das maligne Gewebe oder das betroffene Organ entfernt. Diese Therapieform wird hauptsächlich bei soliden Tumoren angewandt, ist jedoch nur möglich, wenn benachbartes Gewebe nicht betroffen ist. Die Strahlentherapie beruht auf dem Einsatz ionisierender, hoch-energetischer Strahlung, mit der das erkrankte Gewebe lokal behandelt wird. Die Strahlung führt dabei zu Schäden an der DNA und damit letztlich zum Zelltod. Diese beiden Therapieformen sind bei metastasierendem Krebs jedoch nur unzureichend anwendbar und werden dann häufig in Kombination mit der Chemotherapie eingesetzt. Diese stützt sich auf die Verabreichung von Zytostatika und zytotoxischen Substanzen, die die Zellteilung auf unterschiedliche Art und Weise inhibieren (Beispiele siehe Tabelle 1.1). Hauptsächlich wird dabei die DNA so modifiziert, dass Prozesse wie Replikation, Transkription oder aber der Aufbau einer korrekten Mitosespindel und damit die Zellteilung unmöglich werden (Hande, 1998). Da Zytostatika generell auf teilungsaktive Zellen wirken, sind auch gesunde Zellen von deren wachstumshemmender Wirkung betroffen, was zu erheblichen Nebenwirkungen führt.

Tabelle 1.1: Beispiele derzeit eingesetzter Substanzen bei der chemotherapeutischen Krebsbehandlung (Hande, 1998; Garnett, 2001; Voet & Voet, 2002; Chen *et al.*, 2005).

Gruppe	Substanzbeispiele
alkylierende Substanzen	Cyclophosphamid, Ifosfamid
Platinanaloga	Cisplatin, Carboplatin
Anthracycline	Doxorubicin, Epirubicin
Pflanzenderivate (Mitosehemmer)	Vinblastin, Vincristin, Paclitaxel
Topoisomerasehemmer	Camptothecin, Etoposid
Antimetabolite	Methotrexat (Folsäureantagonist), 5-Fluorouracil (Pyrimidinanalogon)

Eine etwas weniger bekannte Behandlungsmöglichkeit stellt die Hormontherapie (bei hormon-abhängigen Tumoren) dar. Deren Konzept beruht auf der Störung der Hormonbalance und damit verbundenen Inhibierung des Tumorwachstums. So basieren beispielsweise die meisten Hormon-therapien zur Behandlung von Brustkrebs auf einem Östrogenentzug des Tumors oder der Blockierung der Östrogenrezeptoren (Goldhirsch *et al.*, 2002; Duffy, 2005). Eine andere, ebenfalls Erfolg versprechende, Möglichkeit zur Behandlung von Krebs stellt die Anti-Angiogenesetherapie dar (Ma & Waxman, 2008). Unter Angiogenese versteht man die Neubildung und das Wachstum von kleinen Blutgefäßen aus einem primitiven Gefäßstamm. Dieser komplexe Prozess wird unter anderem durch verschiedene angiogenetische Wachstumsfaktoren, wie z. B. dem *Fibroblast Growth Factor* (FGF) oder dem *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), gesteuert (Korc & Friesel, 2009). Solide Tumoren benötigen ab einer gewissen Größe neue Blutgefäße für die Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff. Da viele solide Tumoren VEGF exprimieren, welches durch die Rezeptorbindung im

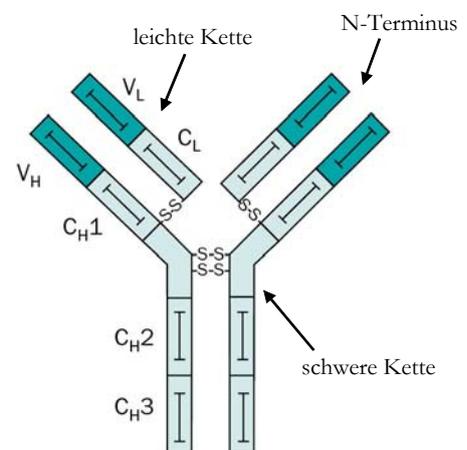
vaskulären Endothel die Angiogenese stimuliert (Weiner *et al.*, 2010), setzt hier die Anti-Angiogenesetherapie durch die Inhibierung der Angiogenese und somit der Reduktion des Tumorwachstums an. So wurde im Jahr 2004 von der FDA (*Food and Drug Administration*) der VEGF-neutralisierende monoklonale Antikörper Bevacizumab zur Behandlung von metastasierendem Darmkrebs zugelassen (Harris, 2004; Schrama *et al.*, 2006, vgl. Kapitel 1.2).

Die meisten klassischen Verfahren zur Behandlung von Krebs sind jedoch von mehr oder weniger starken Nebenwirkungen begleitet bzw. zeigen nur eine unzureichende Effizienz, was häufig auf eine zu geringe Wirkstoffkonzentration am Zielort zurückzuführen ist. Hier zeigt sich auch deutlich ein großes Problem der herkömmlichen Behandlungsmethoden; die Therapie sollte einerseits so effizient und aggressiv wie möglich sein, um den Tumor komplett zu zerstören, andererseits ist es genau diese Aggressivität, die für die Vielzahl an Nebenwirkungen verantwortlich ist. Somit stellen die Verbesserung der Wirksamkeit und die Verminderung von Nebenwirkungen wichtige Ziele bei der Entwicklung neuer Behandlungsmöglichkeiten dar. Eine dieser Möglichkeiten ist die Immuntherapie, bei der der Einsatz monoklonaler tumorspezifischer Antikörper eine entscheidende Rolle spielt.

## 1.2 Monoklonale Antikörper in der Krebstherapie

Bei der Immuntherapie nehmen monoklonale Antikörper eine zentrale Rolle ein. Dabei handelt es sich um tetramere Proteine, die aus jeweils zwei identischen schweren und zwei identischen leichten Ketten bestehen. Die Struktur eines Antikörpers ist in Abbildung 1.2 schematisch dargestellt. Da von der schweren Kette fünf Isotypen existieren, werden die Immunglobuline in fünf Klassen eingeteilt (IgM, IgD, IgG, IgE, IgA). Für die Bindung der Antikörper an die entsprechenden Antigene sind die variablen N-terminalen Domänen der leichten Ketten ( $V_L$ ) und der schweren Ketten ( $V_H$ ) verantwortlich. Diese Domänen enthalten so genannte hypervariable Bereiche (CDRs = *complementarity determining regions*), bei denen sich die Aminosäuresequenz von Antikörper zu Antikörper stark unterscheidet. Die CDRs je einer leichten und schweren Kette sind zusammen für die hochaffine und spezifische Bindung an das Antigen verantwortlich (Davies & Cohen, 1996).

Die Basis für die Immuntherapie mit monoklonalen Antikörpern ist das Immunsystem, welches genutzt werden soll, um die Krebszellen zu zerstören. Die Bindung von Antikörpern an Zellen kann jedoch auch die Funktion von Rezeptoren blockieren. Durch die Bindung der Antikörper an tumorspezifische Antigene auf der Oberfläche der Krebszelle werden diese für das Immunsystem markiert. Für einen erfolgreichen Einsatz eines monoklonalen Antikörpers in der Krebstherapie muss dieser zwischen normalen Zellen und Krebszellen unterscheiden können. Daher sollten die tumorspezifischen Antigene idealerweise nur von Krebszellen dauerhaft auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Als Antigene werden hauptsächlich Glykoproteine (z. B. TAG72), Glykolipide (z. B. Ganglioside wie GD2),



**Abbildung 1.2:** Schematische Darstellung eines Antikörpers. Die variablen Domänen sind in dunkelgrün, die konstanten Domänen in hellgrün dargestellt (Harris, 2004).

Kohlenhydrate (z. B. Lewis Y) und Rezeptoren für Wachstumsfaktoren (z. B. HER2/NEU (ERBB2)) adressiert (Harris, 2004). Bei der so genannten antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (ADCC, *antibody-dependent cellular cytotoxicity*) kommt es nach der Antikörperbindung an die Krebszellen zur Rekrutierung und Aktivierung von Effektorzellen (Neutrophile und Natürliche Killerzellen) (Gorter & Meri, 1999), welche in ihrer Plasmamembran Rezeptoren für die Erkennung der konstanten Region des Antikörpers (Fc-Teil) besitzen (Woof & Burton, 2004). Die Krebszellen werden dann in Abhängigkeit vom Effektorzelltyp phagozytiert oder durch die Lyse der Zellmembran zerstört (Carter, 2001). In der therapeutischen Wirkung der monoklonalen Antikörper Rituximab, Trastuzumab und Cetuximab wird der antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität ein klarer Beitrag zugeschrieben (Adams & Weiner, 2005). Eine weitere Möglichkeit zur Eliminierung der Krebszellen stellt die Aktivierung des Komplementsystems (CDC, *complement-dependent cytotoxicity*) dar. Das Komplementsystem besteht aus einer plasmatischen proteolytischen Enzymkaskade. Die Aktivierung des Komplementsystems wird durch die Rekrutierung der Komplementkomponente C1q durch die an die Zelloberfläche gebundenen Antikörper initiiert. Dies führt zur Aktivierung der Enzymkaskade, was letztlich zur Zerstörung der Plasmamembran und zur Zelllyse führt. Alternativ zur Enzymkaskade und Zelllyse werden die Krebszellen durch Phagozytose eliminiert (Gorter & Meri, 1999; Carter, 2001).

Den Grundstein für die Entwicklung monoklonaler Antikörper legten Köhler und Milstein (1975) mit der Immunisierung von Ratten und Mäusen. Die so gewonnenen murinen Antikörper wiesen jedoch eine äußerst immunogene Wirkung auf, waren ineffizient und besaßen kurze Halbwertszeiten (Glennie & Johnson, 2000). Zur Verringerung der Immunogenität wurden von Boulianne *et al.* (1984) und Morrison *et al.* (1984) Antikörperchimären hergestellt, bei denen die variablen Domänen von der Maus und die konstanten Domänen vom Mensch stammten. Auf diese Weise wurde die Immunogenität zwar gesenkt, jedoch nicht vollständig eliminiert, so dass von Jones *et al.* (1986) humanisierte Antikörper entwickelt wurden. In den variablen Domänen eines humanisierten Immunglobulins stammen dabei lediglich die für die Antigenbindung notwendigen CDRs von Mausantikörpern. Dies zog zwar eine starke Reduktion der immunogenen Wirkung nach sich, jedoch auch einen Verlust der Bindungsaffinität. Eine Weiterentwicklung stellten humane Antikörper dar, die ihrem jeweiligen Antigen gegenüber eine hohe Affinität aufwiesen. Solche humanen Antikörper wurden beispielsweise aus transgenen Mäusen gewonnen, denen humane Immunglobulin-Gene eingesetzt wurden. Nach einer erfolgten Immunisierung produzierten die Mäuse dann „menschliche Antikörper“ (Fishwild *et al.*, 1996). Seit dieser Zeit wurden monoklonale Antikörper und darauf basierende Therapien ständig weiter entwickelt. Mittlerweile fanden zahlreiche monoklonale Antikörper Eingang in die Krebstherapie. Einige Beispiele der durch die FDA zugelassenen monoklonalen Antikörper sind in Tabelle 1.2 aufgelistet. Während der klinischen Phase II der Prüfung von Rituximab (Rituxan), dem ersten in der USA zugelassenen monoklonalen Antikörper zur Behandlung von Non-Hodgkin-Lymphomen, zeigte sich, dass lediglich die Hälfte der Patienten auf die Behandlung ansprach (McLaughlin *et al.*, 1998). In einer anderen Studie innerhalb der klinischen Phase II sprachen auf Gemtuzumab (Mylotarg) lediglich 27 % der über 65-jährigen Patienten an (Nabhan *et al.*, 2005). Diese und viele weitere Beispiele zeigen, dass mit monoklonalen Antikörpern beachtliche Behandlungserfolge in der Krebstherapie erzielt werden konnten und können, die Wirksamkeit der Antikörper jedoch noch weiter gesteigert werden muss. Durch die Konjugation der Antikörper mit

beispielsweise zytotoxischen oder immunmodulatorischen Komponenten kann die Wirksamkeit und Effizienz der therapeutischen Antikörper weiter erhöht werden.

Tabelle 1.2: Durch die FDA zugelassene monoklonale Antikörper für die Krebstherapie (Weiner *et al.* 2010).

Antikörper	Antigen	Antikörper- typ	Krebsart	Zulassungsjahr <sup>1)</sup> / Referenz
Rituximab (Rituxan)	CD20	chimär	Non-Hodgkin- Lymphom	1997 / McLaughlin <i>et al.</i> (1998)
Trastuzumab (Herceptin)	HER2/neu	humanisiert	Brustkrebs	1998 / Vogel <i>et al.</i> (2002)
Alemtuzumab (Campath)	CD52	humanisiert	chronische lympho- zytische Leukämie	2001 / Lundin <i>et al.</i> (2002)
Cetuximab (Erbix)	EGFR	chimär	Darmkrebs	2004 / van Cutsem <i>et al.</i> (2009)
Bevacizumab (Avastin)	VEGF	humanisiert	Darmkrebs, Brust- und Lungenkrebs	2004 / Hurwitz <i>et al.</i> (2004)
Ofatumumab (Arzerra)	CD20	human	chronische lympho- zytische Leukämie	2009 / Wierda <i>et al.</i> (2010)
Gemtuzumab (Mylotarg) <sup>2)</sup>	CD33	humanisiert	akute myeloide Leukämie	2000 / Sievers <i>et al.</i> (1999)
Tositumomab (Bexxar) <sup>2)</sup>	CD20	murin	Lymphom	2003 / Kaminski <i>et al.</i> (2000)

<sup>1)</sup> Das angegebene Jahr bezieht sich auf die Erstzulassung. Es sind Zulassungen in späteren Jahren für andere Krebserkrankungen möglich.

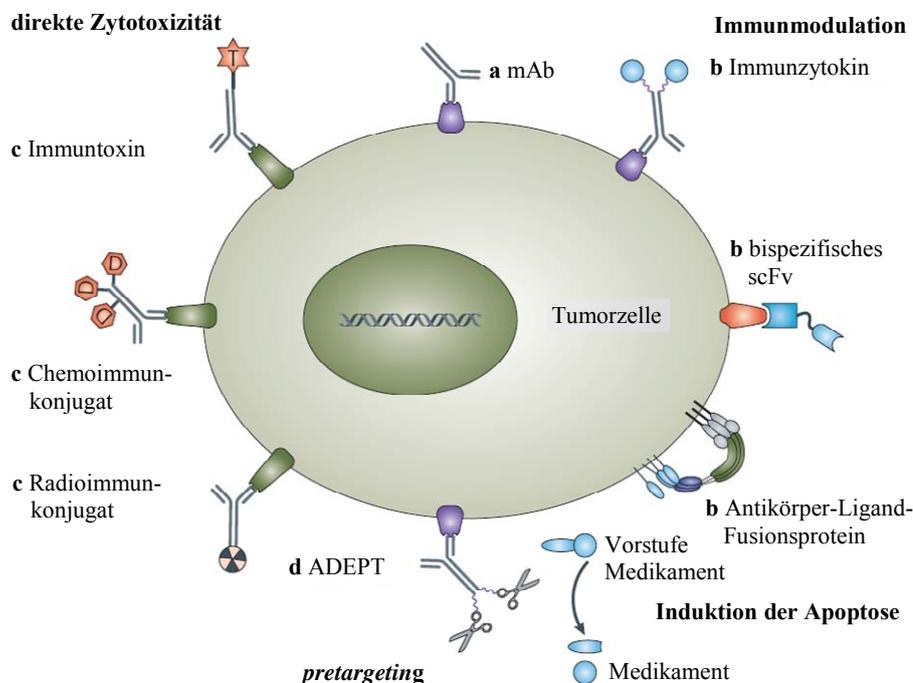
<sup>2)</sup> Antikörper, die als Radionuklid- bzw. Chemotherapeutika-Konjugate vorliegen.

FDA – *Food and Drug Administration* (Zulassungsbehörde USA), EGFR – *epidermal growth factor receptor*, HER2 – *human epidermal growth factor receptor 2*, VEGF – *vascular endothelial growth factor*

### 1.3 Immunkonjugate

Um die Wirksamkeit und therapeutische Effizienz monoklonaler Antikörper zu steigern, werden verschiedene Strategien verfolgt. So werden unkonjugierte Antikörper genutzt, um eine Immunantwort auszulösen (ADCC bzw. CDC), stark exprimierte Wachstumsfaktoren-Rezeptoren zu inhibieren oder aber die Angiogenese (Bildung neuer Blutgefäße in den Tumoren) zu blockieren. Diese Antikörper können aber auch genutzt werden, um das *targeting* von Wirkstoffen zu den Krebszellen zu vermitteln (Adams & Weiner, 2005). In Abbildung 1.3 sind einige Strategien zur Verbesserung der Wirksamkeit therapeutischer Antikörper dargestellt. Auf die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) und die Aktivierung des Komplementsystems (CDC) wurde bereits in Kapitel 1.2 eingegangen (Abbildung 1.3 (a)). Die Fusionierung von Antikörpern mit Zytokinen zielt auf eine Erhöhung der Zytokinkonzentration im Tumor ab, was die Antitumor-Immunantwort durch B-Zellen, T-Zellen und Natürliche Killerzellen stimulieren soll (Lode *et al.*, 1998, Abbildung 1.3 (b)). Dabei kamen u. a. bereits Interleukin-2 (Xiang *et al.*, 1997; Rosenberg *et al.*, 1998) und der Granulozyten-

Makrophagen koloniestimulierende Faktor (GM-CSF) (Robinson *et al.*, 1998) als Immunzytokine zum Einsatz. In vielen Krebszellen ist der programmierte Zelltod, die Apoptose, fehlreguliert. Da diese Zellen trotzdem der Apoptose unterliegen können, kann die Apoptose durch das gezielte Ansteuern von „Todesrezeptoren“ durch äußere Faktoren (z. B. FasL, TNF, TNF-abhängiger Apoptose-induzierender Ligand (TRAIL)) initiiert werden (Pukac *et al.*, 2005; Schrama *et al.*, 2006)). Bispezifische bzw. bivalente Antikörper (*bispecific* scFv) bestehen aus zwei verschiedenen scFv-Fragmenten, deren V<sub>H</sub>- und V<sub>L</sub>-Domänen mit einem Peptidlinker verknüpft sind (siehe 1.3.1.2). Diese bispezifischen Antikörper sind in der Lage, zwei verschiedene Antigene zu erkennen und können durch die Bindung an die Krebszelle die Aktivierung zytotoxischer Zellen vermitteln, was zur Zerstörung der Tumorzellen führt (Segal *et al.*, 1999). So konnte für einen bivalenten Antikörper (Antigene CD19 und CD3) gezeigt werden, dass er die Lyse von Tumorzellen durch T-Zellen vermittelte (Kipriyanov *et al.*, 1998).



**Abbildung 1.3:** Schematische Darstellung der Strategien zur Verbesserung der Wirksamkeit tumorspezifischer, therapeutischer Antikörper (nach Schrama *et al.*, 2006).

(a) Durch die Bindung monoklonaler Antikörper an Krebszellen können diese, hervorgerufen durch die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) oder durch die Aktivierung des Komplementsystems (CDC), zerstört werden.

(b) Das *targeting* von Zytokinen oder immunmodulatorischen Molekülen zum Tumor, durch bispezifische *single chain* Fv (scFv) oder Antikörper-Ligand-Fusionsproteine (ALFP), verändert die Immunantwort gegen den Tumor. Zusätzlich können ALFPs die Apoptose der Zielzelle induzieren.

(c) Eine direkte Zytotoxizität kann durch die Konjugation des Antikörpers mit zytotoxischen Wirkstoffen (D), Toxinen (T) oder Radionukliden vermittelt werden.

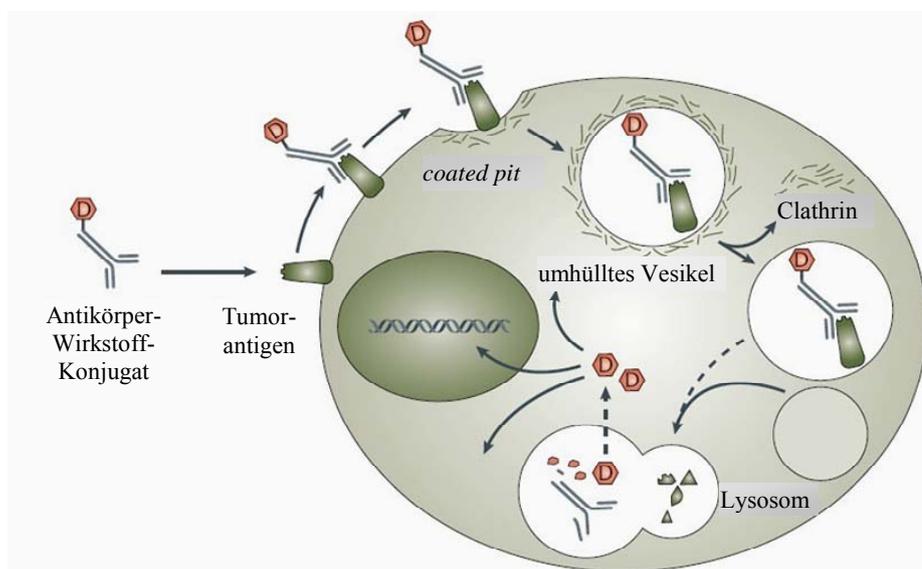
(d) Bei dieser Strategie wird ein Fusionsprotein aus Antikörper und Enzym verabreicht. Nach der Erkennung und Bindung der Krebszellen wird die inaktive Vorstufe eines Medikamentes verabreicht, welches von dem Enzym in die biologisch wirksame Form überführt wird.

Eine weitere Möglichkeit, die Wirksamkeit therapeutischer Antikörper zu erhöhen, ist die kovalente Kopplung mit Radionukliden, chemotherapeutisch eingesetzten Substanzen und Toxinen (Abbildung 1.3 (c)). Bei einer Kopplung mit Radionukliden werden z. B. die  $\beta$ -Strahler  $^{131}\text{Jod}$  oder  $^{90}\text{Yttrium}$  verwendet (Milenic & Brechbiel, 2004). Die mittlere Reichweite der von  $^{90}\text{Yttrium}$  ausgesendeten  $\beta$ -Teilchen beträgt mehr als 200 Zellen (Zalutsky & Vaidyanathan, 2000). Dies hat den Vorteil, dass auch benachbarte Zellen, die möglicherweise kein tumorspezifisches Antigen mehr besitzen, zerstört werden. Es können jedoch auch gesunde Zellen geschädigt und zerstört werden. Substanzen, die in der Chemotherapie zum Einsatz kommen (vgl. Tabelle 1.1), werden oftmals in suboptimalen Dosen verabreicht und greifen aufgrund ihrer Wirkung auf teilungsaktive Zellen auch gesundes Gewebe an. Daher sollte das *targeting* dieser Substanzen zu den Krebszellen dieses Problem umgehen können. So wurden beispielsweise Antifolate (Shen *et al.*, 1986) oder auch Anthracycline (Dillman *et al.*, 1988) mit monoklonalen Antikörpern gekoppelt. In präklinischen Studien erwiesen sich diese Konjugate als effizient (Deguchi *et al.*, 1986), jedoch nicht in klinischen Tests (Tolcher *et al.*, 1999). Schließlich gibt es noch die Strategie des *pretargeting* (Abbildung 1.3 (d)). Dabei erfolgen Erkennung und Bekämpfung des Tumors zeitlich versetzt, da mehrere Komponenten in einzelnen Behandlungsschritten verabreicht werden. Ein Enzym, welches an einen tumorspezifischen Antikörper fusioniert wurde, kann nach der Erkennung und Bindung der Zielzelle durch den Antikörper eine verabreichte inaktive Vorstufe eines Medikamentes in die aktive Form überführen (Bagshawe, 1987; Denny, 2004). Der klare Vorteil dieser Methode liegt in der katalytischen Wirksamkeit, d.h. ein einzelnes Enzymmolekül kann mehrere inaktive Vorstufen des Medikamentes in die aktive Form überführen. Auf die hier bereits erwähnten Antikörper-Toxin-Konjugate wird im nachfolgenden Kapitel näher eingegangen. Des Weiteren wird die hier nicht näher beschriebene Möglichkeit der Kopplung eines Antikörpers mit einem Liganden, der zur Aktivierung und Rekrutierung einer Effektorzelle führen soll, in einem der nachfolgenden Kapitel näher erläutert.

### 1.3.1 Immuntoxine

Der Begriff Immuntoxine beschreibt bifunktionelle, chimäre Moleküle, welche aus einer zellbindenden Komponente und einem Toxin bestehen. Bei der zellbindenden Komponente handelt es sich meistens um Antikörper bzw. Antikörperfragmente, bei den Toxinen fast ausschließlich um zytotoxische Proteine. Das therapeutische Ziel der Immuntoxine umfasst den Transport des Antikörper-Toxin-Konjugates zur Oberfläche der Krebszelle, wo der Antikörper an das tumorspezifische Antigen bindet, was zur Internalisierung des Toxins und damit zum Zelltod führt (FitzGerald *et al.*, 2004). Als toxische Moleküle kommen hauptsächlich bakterielle und pflanzliche Toxine zum Einsatz, so z. B. pflanzliche Toxine wie Rizin (Manske *et al.*, 1986), Saporin (Glennie *et al.*, 1987; Flavell *et al.*, 1998), Gelonin (McGraw *et al.*, 1994) oder aber Bouganin (Cizeau *et al.*, 2009). Bei den bakteriellen Toxinen sind im Wesentlichen das *Pseudomonas* Exotoxin (Kreitman, 200; 2001; Kleinschmidt *et al.*, 2003) und das *Diphtherie* Toxin (Bacha *et al.*, 1988) zu nennen. Die Wirkung der Toxine ist unterschiedlich; einige zerstören die Zellmembran, andere stören die zytosolische Proteinbiosynthese (Frankel & Woo, 2009). Der Vorteil der katalytisch wirksamen Immuntoxine liegt darin, dass oft ein einziges aufgenommenes Toxinmolekül ausreicht, um eine Zelle zu töten (Yamaizumi *et al.*, 1978). Die Anzahl der aufgenommenen Toxinmoleküle ist dabei nicht

abhängig von der extrazellulären Toxinkonzentration (wie bei chemotherapeutisch eingesetzten Substanzen), sondern von der Anzahl der auf der Zelloberfläche vorhandenen Rezeptoren (Kreitman & Pastan, 1998). Als mögliche geeignete Antigene bzw. Rezeptoren für Immuntoxine haben sich unter vielen anderen CD20 (Non-Hodgkin-Lymphom, Press, 1999), IL-2R ((CD25) B- und T-Zell-Lymhome, Batra *et al.*, 1989), ErbB2 (Brust- und Magenkrebs, Batra *et al.*, 1992), Lewis Y (Brust-, Lungen-, Dickdarmkrebs, Pastan *et al.*, 1991), Mesothelin (Eierstockkrebs, Chang & Pastan, 1996) und der Transferrinrezeptor (Hirntumore, Batra *et al.*, 1989) herausgestellt. Die Toxine müssen für einen therapeutischen Einsatz einige Voraussetzungen erfüllen. Die Bindungsstellen für Antigene bzw. Rezeptoren, die auf der Oberfläche von normalem Gewebe exprimiert werden, müssen entfernt bzw. modifiziert werden können, ohne dass ein Aktivitätsverlust auftritt (Frankel *et al.*, 2000; Johannes & Decaudin, 2005). Das Toxin sollte eine hohe Toxizität, möglichst im niederen nanomolaren Bereich, aufweisen (Dyba *et al.*, 2004), da die Expression des jeweiligen Rezeptors durchschnittlich weniger als  $10^5$  Moleküle/Zelle umfasst (Johannes & Decaudin, 2005). Des Weiteren, und dies ist das wichtigste Kriterium, muss das Toxin nach der Bindung des Antikörpers an das Antigen in die Zelle aufgenommen werden und in der Lage sein, der proteolytischen Prozessierung und der sauren Umgebung der Lysosomen stand zu halten (Chen *et al.*, 2005). Die Aufnahme eines solchen Immunkonjugates erfolgt dabei über rezeptorvermittelte Endozytose (Abbildung 1.4), wobei das Toxin nach der Aufnahme in die Zelle aus den Lysosomen entlassen wird und seine zytotoxische Aktivität in der Zelle entfalten kann (Garnett *et al.*, 2001).



**Abbildung 1.4:** Schematische Darstellung der Aufnahme eines Immunkonjugates in eine Krebszelle durch rezeptorvermittelte Endozytose (nach Schrama *et al.*, 2006).

Nach der Bindung des tumorspezifischen Antikörpers an das Antigen auf der Krebszelle erfolgt die Aufnahme des Konjugates mittels Clathrin-abhängiger Endozytose. Der Transport in die Zelle erfolgt über verschiedene endosomale Stadien. Nach der Fusionierung von Endosom und Lysosom wird das Toxin vom Antikörper abgespalten. Nach der Freisetzung aus dem Lysosom kann das Toxin seine zytotoxische Wirkung entfalten.

Immuntoxine können in drei Klassen unterteilt werden. Klasse I Toxine sind intrazelluläre Enzyme, welche die Proteinbiosynthese inhibieren, entweder durch Modifikation des Elongationsfaktor 2 (z. B.

*Pseudomonas* Exotoxin), Modifikation der ribosomalen RNA (z. B. Rizin, Saporin) oder Abbau der gesamten RNA (Ribonuklease) (Frankel *et al.*, 2003). Klasse II Toxine lösen intrazelluläre Signalwege aus (Chovnick *et al.*, 1991) und Klasse III Toxine schließlich sind porenbildende Peptide, welche die Plasmamembran zerstören (z. B. das pflanzliche *Pyrularia* Thionin Peptid (Gasanov *et al.*, 1995)).

Die ersten Immuntoxine wurden mittels chemischer Quervernetzung über Disulfidbrücken hergestellt, zeigten jedoch oft eine zu große molekulare Heterogenität. Andere Möglichkeiten, die beiden Komponenten chemisch zu verknüpfen, sind beispielsweise Carbodiimide (Knüpfung einer Peptidbindung), Disulfidbrücken (bei vorhandenen zugänglichen Cysteinen), stabile Thioether oder auch enzymatisch abbaubare *linker* (Garnett, 2001). Um die Heterogenität jedoch weiter zu reduzieren, werden Immuntoxine mittlerweile hauptsächlich rekombinant hergestellt, in dem das Toxin und der Antikörper genetisch miteinander fusioniert vorliegen, wie z. B. bei dem Immuntoxin dsFvB3-PE38 (Reiter *et al.*, 1994). Oftmals müssen die Toxine deglykosyliert werden, um einer schnellen Beseitigung durch Mannose-Rezeptor exprimierende Leberzellen zu entgehen (Thorpe *et al.*, 1988). Die oft stark immunogene Wirkung der Proteintoxine (Posey *et al.*, 2002), reduziert nicht nur die Halbwertszeit im Serum, sondern inhibiert auch die zytotoxische Aktivität in signifikanter Weise (Schrama *et al.*, 2006). Diese Probleme wurden beispielsweise durch die gleichzeitige Verabreichung von Immunsuppressiva (Oratz *et al.*, 1990), die Modifikation des Toxins mit Polyethylenglykol (Wang *et al.*, 1993; Tsutsumi *et al.*, 2000) oder die Mutagenese des Toxins zur Herstellung weniger immunogener Varianten (Mathew & Verma, 2009) versucht zu umgehen.

Obwohl die ersten Konzepte für Immuntoxine bereits in die 70er Jahre zurückführen, damals fand das *Diphtherie* Toxin in Fusion mit einem Antikörper Anwendung (Moolten & Cooperband, 1970), ist bis heute noch kein einziges Antikörper-basiertes Immuntoxin für die Krebsbehandlung zugelassen. Die größten Probleme liegen in der zu geringen Halbwertszeit im Serum, in der oft zu geringen Spezifität gegenüber Krebszellen und in der schlechten Tumorenpenetration. So konnten hinsichtlich des letzten Punktes insbesondere bei soliden Tumoren bisher kaum Erfolge erzielt werden. Bei hämatologischen Krebserkrankungen hingegen gibt es bereits Erfolg versprechende Ergebnisse (Kreitman *et al.*, 2005; Dang *et al.*, 2007). Dennoch befinden sich bereits einige Immuntoxine in klinischen Testphasen (siehe Tabelle 1.3). Das bislang einzige von der FDA in den USA zugelassene Immuntoxin ist ONTAK (DAB<sub>389</sub>IL2 bzw. Denileukin Diftitox), welches aus Interleukin-2 und einem verkürzten *Diphtherie* Toxin besteht und im Wesentlichen für T-Zell-Lymphome eingesetzt wird (Piascik, 1999).

Tabelle 1.3: Übersicht über einige Immuntoxine, deren Komponenten, Antigene, Krebsart und Wirkmechanismus, die sich derzeit in klinischen Testphasen befinden.

Immuntoxin	Krebsart	Mechanismus	Antigen	Binde-molekül	Toxin	klin. Phase	Referenz
CAT-8015	CLL <sup>1)</sup> , HCL <sup>2)</sup> , NHL <sup>3)</sup>	stimuliert Apoptose	CD22	anti-CD22- dsFv	<i>Pseudomonas</i> Exotoxin	I	Bang <i>et al.</i> (2005)
VB6-845	solide Tumore	ribosomaler Protein- inhibitor	EpCAM	anti- EpCAM-Ab	Bouganin	I	Chahal <i>et al.</i> (2006)

Immuntoxin	Krebsart	Mechanismus	Antigen	Bindemolekül	Toxin	klin. Phase	Referenz
Zemab	Krebs	HER2 Inhibitor	ErbB2/HER2	anti-HER2-Rezeptor	<i>Pseudomonas</i> Exotoxin	I	von Minckwitz <i>et al.</i> (2005)
DT388IL-3	AML <sup>4)</sup>	Proteinsynthese-Inhibitor	IL-3R	IL-3	<i>Diphtheria</i> Toxin	II	Frankel <i>et al.</i> (2008)
LMB-2	Lymphome & Leukämie	Proteinsynthese-Inhibitor	CD25	anti-CD25-Fv	<i>Pseudomonas</i> Exotoxin38	I	Kreitman <i>et al.</i> (1999)
LMB-1	Adenokarzinom	Proteinsynthese-Inhibitor	Lewis Y	Antikörper B3	<i>Pseudomonas</i> Exotoxin38	I	Pai <i>et al.</i> (1996)
LL2-Onconase	NHL	Abbau RNA	CD22	anti-CD22-Antikörper	Onconase (RNaseA)	III	Pavlakakis & Vogelzang (2006)

<sup>1)</sup> chronisch lymphozytische Leukämie, <sup>2)</sup> Haarzell-Leukämie, <sup>3)</sup> Non-Hodgkin-Lymphom, <sup>4)</sup> akute myeloische Leukämie, Ab – Antikörper, *Pseudomonas* Exotoxin38 – verkürzte Variante des *P.* Exotoxin, EpCAM – epitheliales Zelladhäsionsmolekül, IL – Interleukin, HER2 – humaner epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor 2

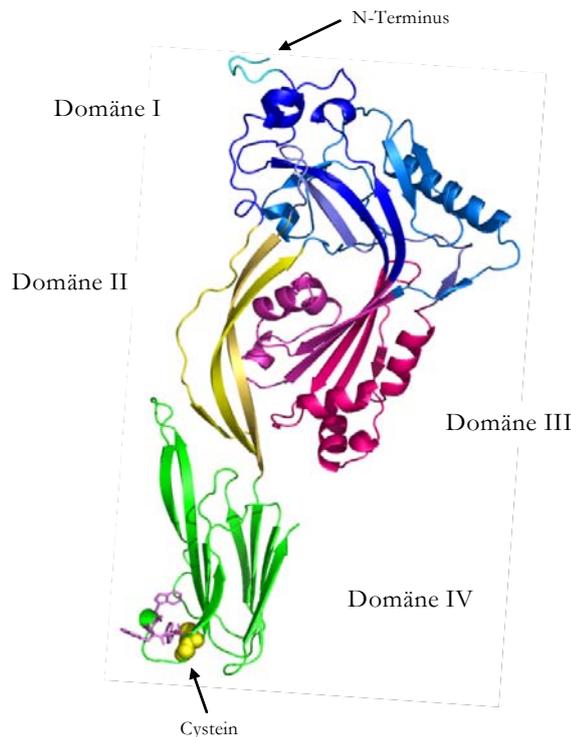
Trotz der auftretenden Probleme implizieren die Vorteile der Immuntoxine ein großes therapeutisches Potenzial. So können sie ihre zytotoxische Wirkung auch bei wirkstoffresistenten Zellen entfalten und Apoptose auslösen (FitzGerald *et al.*, 1987; Perentesis *et al.*, 1997). Die Tumorpenetration kann durch verkleinerte Bindemoleküle, also durch die Nutzung von Antikörperfragmenten statt Antikörpern, verbessert werden. Letztlich sind für einen erfolgreichen Einsatz rekombinanter Immuntoxine in der Krebstherapie die Affinität, Spezifität, Immunogenität und Toxizität entscheidend.

### 1.3.1.1 Listeriolysin O

Das Protein Listeriolysin O ist ein porenbildendes, zytolytisches Protein von *Listeria monocytogenes* und als solches als toxische Komponente für Immuntoxine interessant.

Der Mikroorganismus *Listeria monocytogenes* ist ein gram-positives, fakultativ intrazelluläres, pathogenes Bakterium, welches in der Lage ist, sowohl in Phagozyten (Makrophagen) (Mackaness, 1962) als auch in nicht-phagozytierende Zellen wie Epithelzellen (Gaillard *et al.*, 1987), Endothelzellen (Drevets *et al.*, 1995) oder Hepatozyten (Wood *et al.*, 1993; Dramsi *et al.*, 1995) einzudringen. Nach der phagozytischen Aufnahme in die Zelle wird *L. monocytogenes* aus den Phagosomen bzw. Vakuolen ins Zytoplasma freigesetzt, wo es sich vermehren kann, um sich anschließend auf andere Zellen auszubreiten (Portnoy *et al.*, 1992, Cossart & Lecuit, 1998). Der größte Virulenzfaktor des Bakteriums ist das Protein Listeriolysin O (LLO), welches für die Freisetzung aus den Phagosomen und das intrazelluläre Überleben von *Listeria* essenziell ist (Cossart *et al.*, 1989; Portnoy *et al.*, 1992; 2002). LLO wird vom Genlokus *hly* kodiert und besitzt eine molekulare Masse von 56 kDa (Mengaud *et al.*, 1987; 1988). Die Inaktivierung des *hly*-Genes resultiert in einem Verlust der lytischen Aktivität, der Inhibierung der phagosomalen Freisetzung und der kompletten Avirulenz des Bakteriums im Maus-Modell (Gaillard *et al.*, 1986; Glomski *et al.*, 2003). Listeriolysin O, erstmals charakterisiert

durch Geoffroy *et al.* (1987), gehört zur Familie der so genannten *cholesterol-dependent pore-forming cytolysins* (CDCs) (Bhakdi *et al.*, 1985; Bayley, 1997; Tweten, 2005), deren Mitglieder eine Sequenzhomologie von 40 – 70 % aufweisen (Jacobs *et al.*, 1999). Es konnten bisher u. a. die Kristallstrukturen des Anthrolysin O (Bourdeau *et al.*, 2009) und des Perfringolysin O (PFO) (Rossjohn *et al.*, 1997, Abbildung 1.5) gelöst werden. Die Proteine PFO und LLO bestehen jeweils aus vier Domänen und besitzen für die gesamte Polypeptidkette eine Sequenzidentität von 42 %. Eine weitere Gemeinsamkeit der Mitglieder dieser Proteinfamilie ist eine konservierte Sequenz im C-terminalen Bereich der Domäne IV, die aus elf Aminosäuren (ECTGLAWEWWR) besteht, in die Membranbindung involviert und für die zytolytische Aktivität der Proteine verantwortlich ist (Jacobs *et al.*, 1999, Dramsi & Cossart, 2002).

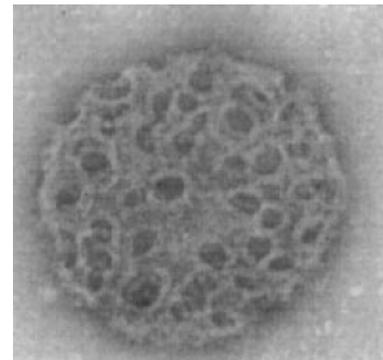


**Abbildung 1.5:** Darstellung der Kristallstruktur des Perfringolysins O (PFO), welches eine Sequenzidentität von 42 % zu Listeriolysin O besitzt. In der C-terminalen Domäne IV befindet sich ein konserviertes Undekapeptid, welches ein Cystein (gelb) und drei Tryptophane (Seitenketten in violett) enthält. Diese Domäne vermittelt den Kontakt zur Zellmembran, in ihr sind 6 der 7 Tryptophane des PFO lokalisiert (nach Rossjohn *et al.*, 1997). (PDB-Eintrag: 1PFO)

PFO und LLO zeigen für diese C-terminale vierte Domäne eine Sequenzidentität von 64 % (Kayal & Charbit, 2006). Innerhalb dieses konservierten Undekapeptides befindet sich das Cystein484, dessen Oxidationsstatus eine entscheidende Rolle in der hämolytischen Aktivität (Fähigkeit zur Zerstörung der Membran nativer Erythrozyten) des LLO spielt (Geoffroy *et al.*, 1987; Giammarini *et al.*, 2003; 2004). Aufgrund dessen lautet eine weitere Bezeichnung für diese Proteinfamilie *thiol-activated cytolysins* (Cowell & Bernheimer, 1977; Billington *et al.*, 2000). In beiden dieser Bezeichnungen spiegeln sich die Eigenschaften dieser Proteine wider; sie können Cholesterin binden und ihre Aktivität ist abhängig vom Oxidationsstatus des konservierten Cysteins. Die Modifizierung des Cysteins mit thiolhaltigen Agenzien führt zu einem Aktivitätsverlust, der jedoch durch Reduktion der Thiolgruppe des Cysteins vollständig reversiert werden kann (Geoffroy *et al.*, 1987; Giammarini *et al.*,

2003). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass ein Austausch des singulären Cysteins gegen Alanin nur zu einem geringen Verlust an hämolytischer Aktivität des LLO führte und mit der des Wildtyp-Protein vergleichbar war (Michel *et al.*, 1990; Stachowiak *et al.*, 2009). Der Austausch des Cysteins gegen Serin dagegen resultierte in völlig anderen Eigenschaften des Proteins (Stachowiak *et al.*, 2009). Beide Proteinvarianten (Ala und Ser) waren jedoch weniger invasiv im Zellkulturmodell und zeigten damit die Wichtigkeit des Cysteins für die Virulenz von *Listeria* (Stachowiak *et al.*, 2009). Der Austausch von einem der drei hydrophoben Tryptophan-Reste im konservierten Undekapeptid hingegen resultierte in einem Aktivitätsverlust von mehr als 95 % (Michel *et al.*, 1990). Ähnliche Ergebnisse wurden auch für andere thiolaktivierte Toxine erhalten (Hill *et al.*, 1994; Sekino-Suzuki *et al.*, 1996). Nach der Bindung an Cholesterin in eukaryontischen Zellmembranen folgt die Membraninsertion der Cholesterin-abhängigen Zytolysine, wobei jedoch lange unklar war, ob Cholesterin als Rezeptor für die Toxine fungiert (Duncan & Schlegel, 1975; Prigent & Alouf, 1976; Johnson *et al.*, 1980). Inzwischen weiß man jedoch, dass nicht alle CDCs Cholesterin benötigen; so bindet Intermedilysin an einen Membranprotein-Rezeptor (CD59) (Giddings *et al.*, 2004; Heuck *et al.*, 2010). Nach der Membranbindung oligomerisieren 20 bis 80 Monomere und bilden eine ringförmige Pore mit einem Durchmesser von 20 bis 30 nm (Bhakdi *et al.*, 1985; Bayley, 1997; Dramsi & Cossart, 2002).

Durch die Inkubation mit Cholesterin kann die hämolytische Aktivität des LLO inhibiert werden (Geoffroy *et al.*, 1987; Jacobs *et al.*, 1998; Giammarini *et al.*, 2003), beeinflusst jedoch nicht die Membranbindung (Jacobs *et al.*, 1998). Für PFO wurde hingegen gezeigt, dass Cholesterin für die Membranbindung essenziell ist (Flanagan *et al.*, 2009). Die Oligomerisierung des PFO (und vermutlich LLO) in der Zellmembran ist mit signifikanten strukturellen Übergängen assoziiert (Shatursky *et al.*, 1999; Ramachandran *et al.*, 2004; Heuck *et al.*, 2007). Es wurden dabei lange Zeit zwei mögliche Mechanismen zur Porenbildung diskutiert



**Abbildung 1.6:** Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Erythrozyten-Membran nach der Zugabe von Listeriolysin O. Die gebildeten Poren sind deutlich zu erkennen (Jacobs *et al.*, 1998).

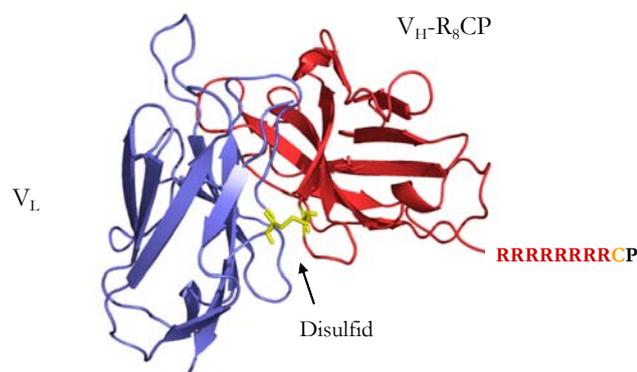
(Heuck *et al.*, 2000): (1) ein Mechanismus, bei dem Monomere an die Membran binden und vor der Insertion in die Lipid-Doppelschicht einen Prä-Poren-Komplex bilden (Walker *et al.*, 1992; Sellman *et al.*, 1997), (2) ein Modell der sukzessiven Vergrößerung eines kleinen Oligomers durch sequenzielle Addition von Monomeren an einen anfänglich insertierten Komplex (Bayley, 1997; Palmer *et al.*, 1998). Inzwischen gibt es jedoch mehrere Untersuchungen, die die erste Theorie untermauern (Heuck *et al.*, 2007). Die Fähigkeit des LLO, Poren in eukaryontischen Membranen zu bilden, ist demnach auch die Grundlage der zytolytischen Aktivität des Proteins. Diese Aktivität ist außerdem pH-abhängig (Geoffroy *et al.*, 1987; Glomski *et al.*, 2002; Giammarini *et al.*, 2003), wobei sie ein Maximum bei pH 5.5 zeigt (Glomski *et al.*, 2002) und demnach auf saure Vakuolen beschränkt ist. LLO weist dabei eine um Faktor 10 höhere Aktivität unter sauren als unter neutralen Bedingungen auf (Glomski *et al.*, 2002). Diese Eigenschaft und das Vorhandensein einer PEST-Sequenz im N-terminalen Bereich des LLO (Decatur & Portnoy, 2000; Schnupf *et al.*, 2006) spielen vermutlich eine regulatorische Rolle, da LLO nach der Freisetzung des Bakteriums aus den Phagosomen einerseits durch den neutralen pH-

Wert im Zytosol in seiner Aktivität eingeschränkt ist und andererseits aufgrund der PEST-Sequenz vermutlich rasch proteolytisch abgebaut wird (Decatur & Portnoy, 2000; Kayal & Charbit, 2006).

Es konnten bereits zytotoxische Effekte nach Infektion mit *Listeria monocytogenes* für dendritische Zellen (Guzman *et al.*, 1996), Makrophagen (Barsig & Kaufmann, 1997) und Hepatozyten (Rogers *et al.*, 1996) nachgewiesen werden. Von Carrero *et al.* (2004; 2008) wurde gezeigt, das rekombinant gewonnene LLO die Apoptose von Lymphozyten einleiten kann. Die signifikanten Unterschiede in der lytischen Aktivität von Cystein-modifizierten und -unmodifiziertem LLO von Faktor 1000 und mehr (Geoffroy *et al.*, 1987; Giammarini *et al.*, 2003, Günther, 2005) und die pH-Wert-abhängige Aktivität machten dieses Protein zu einer interessanten toxischen Komponente in einem Immuntoxin. In dieser Arbeit wurde LLO in Kombination mit dem tumorspezifischen Antikörperfragment B3 als Immuntoxin untersucht.

### 1.3.1.2 B3-Antikörperfragment

Das Fv-Fragment eines Antikörpers ist die kleinste funktionelle Einheit, welche die Bindungscharakteristik und Spezifität des gesamten Antikörpers aufweist. Die geringere Größe macht es aufgrund der gleichen Affinität und Spezifität für den klinischen Einsatz (z. B. *targeting* von Immuntoxinen) wertvoller. Das Fv-Fragment ist ein Heterodimer, welches aus den beiden Domänen  $V_H$  und  $V_L$  besteht, die nicht-kovalent miteinander assoziiert vorliegen. Bei rekombinant gewonnenen Antikörperfragmenten verknüpft oft ein kurzer Peptidlinker die beiden Domänen, um sie zu stabilisieren. Diese so genannten *single chain*-Fragmente (scFv) weisen jedoch in einigen Fällen eine verminderte Affinität auf (Reiter *et al.*, 1994), da der Peptidlinker in die Nähe der bindenden Region kommen und somit die Antigenbindung stören kann. Eine mögliche Alternative zu den scFvs stellt, wie im Falle des Antikörperfragmentes B3-R<sub>8</sub>CP (siehe Abbildung 1.7), die Verknüpfung der beiden Domänen über eine intermolekulare Disulfidbrücke zum dsFv dar (Glockshuber *et al.*, 1990; Brinkmann *et al.*, 1993, Jung *et al.*, 1994). Daneben wurde jedoch eine große Anzahl weiterer Antikörper-basierter Bindemoleküle entwickelt (Enever *et al.*, 2009).



**Abbildung 1.7:** In dieser Abbildung ist die Kristallstruktur des Antikörperfragmentes dsFvB1 dargestellt, welches homolog zu B3 ist (nach Almog *et al.*, 1998, PDB-Eintrag: 1DSF). Die schwere Kette der variablen Domäne (rot) ist über eine intermolekulare Disulfidbrücke (gelb) mit der leichten Kette der variablen Domäne (blau) verknüpft. Die schwere Kette ist C-terminal um ein polyionisches Fusionspeptid, bestehend aus 8 Argininen, einem Cystein und einem Prolin, verlängert.

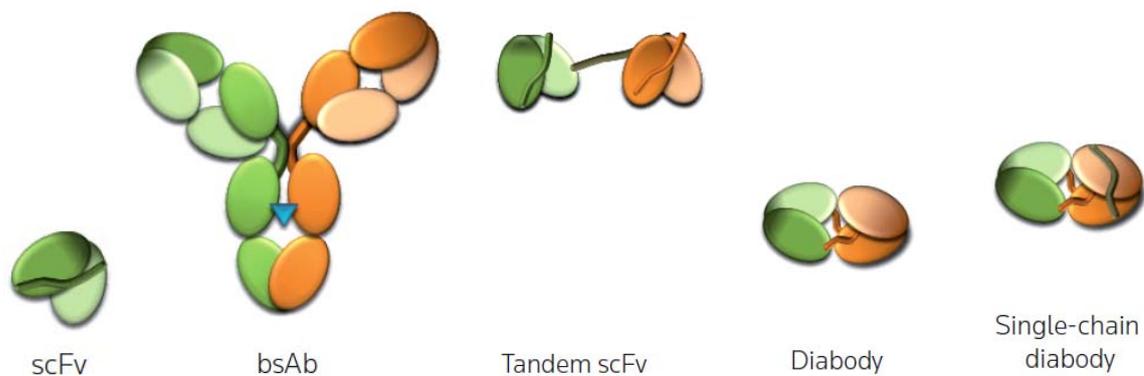
Die eingefügte artifizielle Disulfidbindung zwischen  $V_H$  und  $V_L$  des Antikörperfragmentes B3 beeinflusst dabei nicht die Antigenbindung (Brinkmann *et al.*, 1993). Der wohl größte Vorteil dieser so genannten dsFvs liegt jedoch in der erhöhten Stabilität der Antikörperfragmente bei 37 °C im Vergleich zu den instabileren scFvs (Benhar *et al.*, 1995). So konnte auch für das disulfidstabilisierte B3-Antikörperfragment (dsFvB3) gezeigt werden, dass die Stabilität bei 37 °C in humanem Plasma deutlich erhöht ist gegenüber der Stabilität des scFvB3, was möglicherweise eine geeignetere therapeutische Anwendung indiziert (Brinkmann *et al.*, 1993). Der monoklonale Antikörper B3 (Maus IgG1 $\kappa$ ) ist gegen Lewis Y und verwandte Kohlenhydrat-Antigene gerichtet, welche auf der Oberfläche vieler Tumorzellen epithelialen Ursprungs (z. B. Dickdarm, Lunge, Eierstöcke, Brust, Prostata) präsentiert werden (Hellstrom *et al.*, 1990; Pastan *et al.*, 1991; Lou & Pastan, 1999). Bei dem Antigen Lewis Y handelt es sich um ein Tetrasaccharid, welches aus den Zuckerresten Fukose, Galaktose und N-Acetylglukosamin besteht. Es ist ein Blutgruppen-verwandtes Antigen, welches auf fast 70 % der humanen epithelialen Karzinome vorkommt (Sakamoto *et al.*, 1986; Schuster *et al.*, 2005). Von den meisten normalen Geweben, mit Ausnahme der Epithelzellen des Gastrointestinaltraktes, wird es jedoch nicht exprimiert (Hellstrom *et al.*, 1990). Für das disulfidstabilisierte B3-homologe Antikörperfragment dsFvB1 wurde die Bindungsaffinität zum Zelloberflächenantigen untersucht und mit einem apparenten  $K_d$  von 3  $\mu$ M bestimmt (Almog *et al.*, 1998). Damit ist die Bindungsaffinität des dsFvB1 zu seinem Antigen Lewis Y im Vergleich mit anderen in der Literatur beschriebenen Antikörperfragmenten nicht sehr hoch. Aufgrund der Homologie zwischen B1 und B3 lassen sich vermutlich Rückschlüsse über die Bindungsaffinität des B3-R<sub>8</sub>CP an Lewis Y ziehen. Trotz der geringen Affinität handelt es sich jedoch um einen hochspezifischen Antikörper. Mit LMB-1 befindet sich ein Immuntoxin, welches aus dem Antikörper B3 und *Pseudomonas* Exotoxin besteht, in der klinischen Phase I (Pai *et al.*, 1996). Ein anderes B3-basiertes Immuntoxin, LMB-9 (dsFvB3-PE38), hat die klinische Phase I abgeschlossen (<http://clinicaltrials.gov>).

Das tumorspezifische Antikörperfragment B3-R<sub>8</sub>CP wurde in dieser Arbeit als zelladressierende bzw. -bindende Komponente des Immuntoxins B3-LLO eingesetzt. Die polyionische Fusion R<sub>8</sub>CP hat dabei keinen Einfluss auf die Antigenbindung des Antikörperfragmentes (Stubenrauch *et al.*, 2001; May *et al.*, 2002).

### 1.3.2 Aktivierung des Immunsystems

Unter der Aktivierung des Immunsystems soll hier die Rekrutierung und Aktivierung von Effektorzellen (T-Zellen, Natürliche Killerzellen) mittels bi- oder multifunktionaler Proteine für die Krebstherapie bezeichnet werden. Dieser Ansatz birgt ein großes Potenzial für die molekulare Krebstherapie. Prinzipiell verfolgt auch der Einsatz tumorspezifischer monoklonaler Antikörper, von denen bereits einige für die Krebstherapie zugelassen sind (vgl. Tabelle 1.2) diesen Ansatz. Durch die Bindung an die Krebszelle wird diese für das Immunsystem markiert. Über die Erkennung des Fc-Teils der Antikörper durch Effektorzellen wird dann die Immunantwort (ADCC) ausgelöst (siehe Kapitel 1.2). Hierbei können jedoch keine bestimmten Zelltypen, wie z. B. zytotoxische T-Lymphozyten rekrutiert und aktiviert werden (Müller & Kontermann, 2007), was zur Entwicklung bifunktionaler Moleküle führte. So sind die ersten bifunktionalen Konjugate bispezifische Antikörper gewesen, die simultan T-Zell-Rezeptoren und einen Tumormarker auf Zielzellen binden konnten

(Staerz *et al.*, 1985) und somit zytotoxische T-Zellen für die Lyse von Krebszellen nutzten. Seit den ersten Ansätzen wurden viele Konstrukte entwickelt und viele Studien zeigten nicht nur das Potenzial dieser bispezifischen Antikörper sondern auch deren Grenzen; eine hohe Immunogenität und Toxizität (Peipp & Valerius, 2002). Um diese Probleme zu umgehen, speziell die Toxizität, die mit den vorhandenen Fc-Teilen der Antikörper einhergeht und somit nicht nur einen Zelltyp rekrutiert, wurden die bispezifischen Antikörper in ihrer Größe auf die bindenden Domänen reduziert (Baeuerle & Reinhardt, 2009). Diese variablen Fragmente (Fv) wurden mit kurzen Peptidlinkern zu den bereits in früheren Kapiteln erwähnten *single chain* Fvs (scFv) verknüpft (Bird & Walker, 1991). Dies ermöglicht die Kombination zweier scFvs unterschiedlicher Spezifitäten mittels eines zusätzlichen *linkers* zu einem Tandemkonstrukt, welches eine Größe von ca. 55 kDa besitzt (Baeuerle & Reinhardt, 2009). Von diesen Tandemkonstrukten ausgehend sind so genannte BiTE-Moleküle (*bispecific T cell engager molecule*) geschaffen worden, welche sehr potent im Maus-Modell sind und beeindruckende Resultate in klinischen Studien aufweisen (Chames & Baty, 2009). Momentan befinden sich zwei dieser BiTE-Moleküle in klinischen Studien; Blinatumomab (MT103, spezifisch für CD3 und CD19) in den klinischen Phasen I/II (Bargou *et al.*, 2008) und MT110 (spezifisch für CD3 und EpCAM) in Phase I (Brischwein *et al.*, 2006), wobei das *target* CD3 die Bindung der Antikörper an alle T-Zellen erlaubt (Baeuerle & Reinhardt, 2009). Durch die Verkleinerung der Länge der Peptidlinker kann die Assemblierung der Domänen verhindert werden, wodurch kompaktere Moleküle, so genannte *Diabodies* geschaffen wurden (Holliger *et al.*, 1993; Wu, 2009). Einige der bisher entwickelten Formate bispezifischer Antikörper sind in Abbildung 1.8 dargestellt.



**Abbildung 1.8:** Diese Abbildung zeigt einige Formate der bispezifischen Antikörper (nach Chames & Baty, 2009). Die helleren Farben stehen für die leichten Ketten, die dunklen Farben für die schweren Ketten der Antikörper und Antikörperfragmente. Unterschiedliche Farben stehen für unterschiedliche Spezifitäten. Die kleinste Einheit ist das *single chain* Fragment der variablen Domäne (scFv). Aus zwei scFvs, die mit einem Peptidlinker verknüpft werden, entstehen Tandem scFvs, deren kompaktere Form aufgrund des verkürzten *linkers* so genannte *diabodies* sind. Durch das Einfügen eines zusätzlichen *linkers* zwischen den Polypeptiden entsteht ein *single chain diabody*. Die früher häufig genutzten bispezifischen Antikörper (bsAb) sind ebenfalls dargestellt.

Trotz der großen Fortschritte, die auf dem Gebiet der bispezifischen Antikörper gemacht wurden, gibt es auch Probleme. So stellen z. B. die immer kleiner werdenden Moleküle zwar einen Vorteil für die Tumorpenetration dar, werden aber durch die Zirkulation im Blut sehr schnell wieder über die Niere ausgeschieden (Chames & Baty, 2009). Um dies zu umgehen, wurden die Moleküle mit Polyethylenglykol konjugiert (Holliger & Hudson, 2005), was jedoch zu einer veränderten Affinität

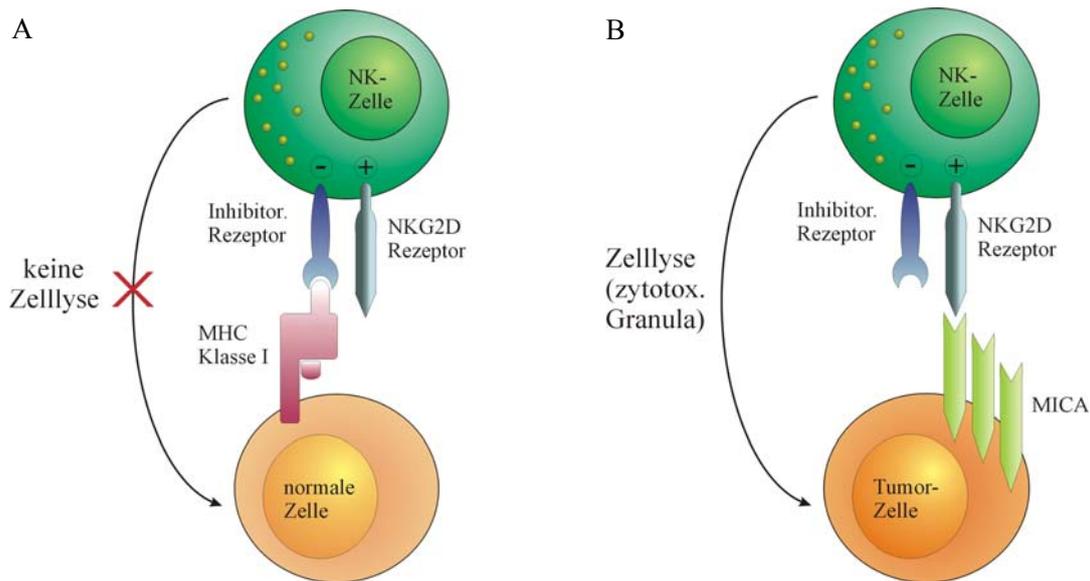
der Antikörper führte (Kubetzko *et al.*, 2006). Daher sind auf dem Gebiet der bispezifischen Antikörper noch weitere Verbesserungen für einen Einsatz in der Krebstherapie nötig.

Eine weitere Möglichkeit der Aktivierung des Immunsystems stellen bispezifische Proteine dar, die aus einem Antikörper bzw. Antikörperfragment bestehen, welche an einen Liganden gekoppelt sind, der an einen Rezeptor auf Effektorzellen binden kann. So wurde von Germain *et al.* (2008) ein bifunktionelles Konstrukt erstellt, welches aus einem anti-Tumor-scFv und einem murinen anti-NKG2D-Liganden (H60) besteht. NKG2D ist ein aktivierender Rezeptor, der u. a. auf Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) präsentiert wird (siehe Kapitel 1.3.2.1). Dies erlaubte die simultane Bindung der scFv-Antigene auf Tumorzellen und des NKG2D-Rezeptors auf NK-Zellen. Dieses bifunktionelle Protein war in der Lage, eine NKG2D-abhängige und Antikörper-spezifische Lyse der Tumorzellen zu induzieren. Ein sehr ähnliches Konzept verfolgten auch von Strandmann *et al.* (2006). Dabei wurde ein bifunktionelles Protein (ULBP2-BB4) generiert, welches aus einem tumorspezifischen Antikörperfragment (BB4) und einem humanen NKG2D-bindenden Liganden (ULBP2) besteht. Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung des ULBP2 an den Rezeptor NKG2D zur Aktivierung der NK-Zellen führte und durch die simultane Bindung an die Tumorzellen deren NK-Zell-vermittelte Lyse induzierte. Im Maus-Modell konnte durch die Verabreichung des BB4-ULBP2 das Tumorwachstum gehemmt werden, was das große klinische Potenzial dieses bispezifischen Proteinkonstruktes aufzeigt. Diese beiden Beispiele für bifunktionelle artifizielle Proteine verdeutlichen einerseits, welches Potenzial Konstrukte bergen, die spezifisch NK-Zellen aktivieren und rekrutieren, andererseits zeigen sie auch den Nutzen, den NK-Zellen in der Tumorthherapie haben können.

### 1.3.2.1 Natürliche Killerzellen

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) wurden vor mehr als 30 Jahren in Mäusen durch Kiessling *et al.* (1975, a, b) entdeckt. Seit dieser Zeit wurden diese Zellen hinsichtlich ihres Ursprungs, ihrer Differenzierung, ihrer Rezeptoren und ihrer Funktionen als Effektorzellen (Colucci *et al.*, 2003; Lanier, 2005; Farag & Caligiuri, 2006) charakterisiert. NK-Zellen sind zytotoxische Zellen, die zum angeborenen Immunsystem gehören und eine wichtige Rolle bei der Immunantwort gegen verschiedene Pathogene, wie Viren (Bukowski *et al.*, 1985), Bakterien oder Parasiten (Tay *et al.*, 1998) und Krebs spielen. Sie stellen eine einzigartige Subpopulation der Lymphozyten dar und besitzen, im Gegensatz zu T-Zellen oder B-Zellen, keine durch somatische Rekombination kodierten Antigen-spezifischen Rezeptoren (Lanier, 2005). Humane NK-Zellen werden heutzutage als CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> Lymphozyten definiert (Lanier *et al.*, 1986), wobei sie im Hinblick auf das Expressionslevel von CD56 noch in zwei funktionell verschiedene Hauptpopulationen eingeteilt werden können (Jacobs *et al.*, 2001; Ljunggren & Malmberg, 2007; Sutlu & Alici, 2009). CD56<sup>bright</sup>-Zellen besitzen vorwiegend eine immunregulatorische Wirkung aufgrund ihrer potenten Zytokinproduktion, wohingegen CD56<sup>dim</sup>-Zellen eine überwiegend zytotoxische Funktion aufweisen (Cooper *et al.*, 2001). Letztere exprimieren außerdem große Mengen des niedrig affinen Fc-Rezeptors (CD16), wodurch sie die *antibody-dependent cellular cytotoxicity* (ADCC) vermitteln können (Ljunggren & Malmberg, 2007). Anfänglich war nicht bekannt, wie NK-Zellen unterscheiden zwischen den Zellen, die sie lysieren und letztlich töten und den „normalen“ Zellen. So fanden Kärre *et al.* (1986) nicht das, was auf den Zielzellen für die Erkennung exprimiert wurde, sondern das, was fehlte. Daraus entstand die „missing self“-Hypothese (Kärre *et al.*, 1986; Ljunggren & Kärre, 1985), die zeigte, dass die NK-Zell-

vermittelte Zytotoxizität durch Tumorzellen ausgelöst wird, bei denen die MHC (*major histocompatibility*) Klasse I-Moleküle teilweise oder komplett fehlen (Ljunggren & Kärre, 1990). Diese Entdeckung führte später zur Identifizierung der so genannten *inhibitory killer-cell immunoglobulin-like receptors* (KIRs), welche die verschiedenen HLA-Allele erkennen. Wenn eine NK-Zelle, die spezifisch für ein bestimmtes MHC Klasse I-Allel ist, mit einer Zielzelle interagiert, der dieses Allel fehlt (*missing self*), dann wird die NK-Zelle nicht inhibiert, was schließlich zur Lyse der Zielzelle führt (Ljunggren & Malmberg, 2007; Abbildung 1.9).



**Abbildung 1.9:** In dieser Abbildung ist die *missing self* Erkennung von Tumorzellen dargestellt. Die Aktivierung von NK-Zellen wird reguliert durch eine Balance zwischen den Signalen der aktivierenden (z. B. NKG2D) und inhibierenden Rezeptoren. Normale Zellen präsentieren MHC Klasse I-Moleküle auf ihrer Zelloberfläche, so dass mehr inhibitorische als aktivierende Rezeptoren binden, die Zelle als „normal“ erkennen und nicht lysieren (A). Nach einer Transformation der Zellen werden MHC Klasse I-Liganden für die inhibitorischen Rezeptoren oft weniger stark exprimiert oder gehen ganz verloren. Zudem können zellulärer Stress und DNA-Schäden zur stärkeren Expression der Liganden (z. B. MICA) der aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren auf Tumorzellen führen. Dies führt zusammen zu einer Änderung der Balance zwischen inhibitorischen und aktivierenden Signalen, was letztlich die zytolytische Effektorfunktion der NK-Zellen induziert und zur Zelllyse führt (B).

In den darauf folgenden Jahren wurden viele der aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren auf NK-Zellen und deren Liganden identifiziert. Heutzutage weiß man, dass die NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität das Ergebnis einer komplexen Balance zwischen den inhibierenden und aktivierenden Rezeptoren der NK-Zellen darstellt (Lanier, 2003). Während inhibitorische Rezeptoren wie die KIRs MHC Klasse I-Moleküle erkennen, deren Expression oftmals verloren geht oder herunter reguliert wird bei infizierten (Lodoen & Lanier, 2005) oder malignen Zellen (Garrido *et al.*, 1997), können aktivierende Rezeptoren wie z. B. die *natural cytotoxicity receptors* (NCRs) NKp30, NKp44 und NKp46 oder die *natural killer group 2 D* (NKG2D) Rezeptoren verschiedene Liganden erkennen, die auf transformierten Zellen exprimiert werden (Moretta *et al.*, 2001). NK-Zellen können jedoch auch durch Zytokine aktiviert werden. Einmal aktiviert, proliferieren NK-Zellen und zeigen eine erhöhte sekretorische und zytolytische Aktivität. Die aktivierten NK-Zellen sezernieren Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ),

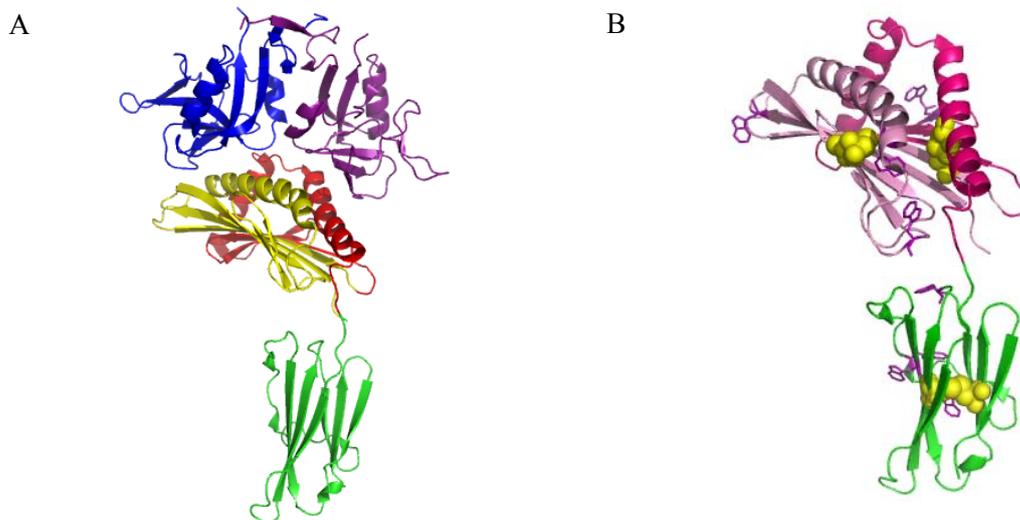
Tumornekrosefaktor (TNF) und den Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierenden Faktor (GM-CSF), wobei diese Zytokine zusammen mit sezernierten Chemokinen Entzündungsreaktionen stimulieren (Ljunggren & Malmberg, 2007). Von Fauriat *et al.* (2010) wurde untersucht, welche Rezeptor-Ligand-Interaktionen bei NK-Zellen minimal benötigt werden, um bestimmte Zytokine und Chemokine zu sekretieren. So konnte z. B. gezeigt werden, dass die Bindung von NKG2D durch den Liganden ULBP1 für die Sekretion diverser Chemokine ausreichte, wohingegen die Sekretion von TNF und IFN $\gamma$  die Bindung zusätzlicher Rezeptoren benötigte.

Durch die Tatsache, dass NK-Zellen humane Tumorzellen erkennen und eliminieren können, wurden unterschiedliche Strategien für die therapeutische Nutzung von NK-Zellen in der Krebstherapie entwickelt. So kann z. B. die Differenzierung und Aktivierung von NK-Zellen durch verschiedene Zytokine wie Interleukin (IL)-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21 sowie IFN $\alpha$  und IFN $\beta$  stimuliert werden (Colucci *et al.*, 2003; Becknell & Caligiuri, 2005). Einige klinische Studien haben die Effekte hinsichtlich der Aktivierung und Ausbreitung der NK-Zellen nach der Verabreichung von IL-2 an Krebspatienten untersucht (Rosenberg, 2000; Farag & Caligiuri, 2004), wobei in Abhängigkeit der Art des Tumors und der Bedingungen, unter denen IL-2 verabreicht wurde, unterschiedliche Ergebnisse erzielt wurden. Es ist weiterhin gezeigt worden, dass die IL-2 vermittelte Aktivierung Natürlicher Killerzellen zu einer zytotoxischen Aktivität gegenüber Zielzellen führen kann, die vormals NK-Zell-resistent waren (Robinson & Morstyn, 1987). So erreichte IL-2 1992 die Zulassung durch die FDA für die Behandlung von metastasierendem Nierenkrebs (Margolin, 2008). Daneben haben sich viele weitere Strategien, wie z. B. die Infusion von NK-Zellen bei hämatologischen Krebsarten oder auch die spezifische Rekrutierung und simultane Aktivierung von NK-Zellen durch bispezifische Proteine (siehe Kapitel 1.3.2) entwickelt. So beinhaltet ein weiterer Ansatz in der NK-Zell-basierten Tumor-Immuntherapie die Nutzung der Zelllinie NK-92 (Gong *et al.*, 1994), welche unter GMP (*good manufacturing practice*)-Richtlinien kultiviert werden kann (Sutlu & Alici, 2009). Diese Zelllinie exprimiert keine KIRs, ist sehr zytotoxisch, präsentiert ein breites Spektrum an aktivierenden Rezeptoren an der Zelloberfläche und besitzt die phänotypische und funktionelle Charakteristik aktivierter NK-Zellen (Gong *et al.*, 1994; Maki *et al.*, 2001). Nach präklinischen Studien mit Mäusen (Yan *et al.*, 1998; Tam *et al.*, 1999) und *ex vivo* Applikationen bei Leukämien, Lymphomen und chronischer myeloischer Leukämie (Klingemann *et al.*, 1996; Maki *et al.*, 2003) wurde diese Zelllinie auch für die direkte Infusion in Patienten genutzt (Tonn *et al.*, 2001; Arai *et al.*, 2008). Durch die stabile Transfektion mit IL-2-cDNA konnte die Zelllinie NK-92 MI generiert werden, welche IL-2-unabhängig ist (Tam *et al.*, 1999). Solche IL-2 unabhängigen NK-Zellen zeigten eine höhere zytotoxische Aktivität gegenüber Tumorzelllinien und eine höhere Aktivität gegenüber Tumoren in Mäusen (Nagashima *et al.*, 1998).

Die IL-2 unabhängige Zelllinie NK-92 MI wurde in dieser Arbeit für Experimente zur Untersuchungen der Rekrutierung und Aktivierung Natürlicher Killerzellen zur Eliminierung von Tumorzellen mit Hilfe des bifunktionellen Proteinkonstruktes B3-MICA genutzt (siehe Kapitel 1.3.2.2).

### 1.3.2.2 Der aktivierende Rezeptor NKG2D und sein Ligand MICA

Der Rezeptor NKG2D der NK-Zellen gehört zu den Typ II Transmembran-Glykoproteinen, welche C-Typ Lektin-ähnliche Domänen (NKDs) besitzen (Weis *et al.*, 1998). Zu den NKDs gehört die Familie der NKG2-Rezeptoren, die sowohl aktivierende als auch inhibierende Vertreter birgt (López-Botet & Bellón, 1999). NKG2D ist ein homodimerer aktivierender Immunrezeptor, der auf den meisten Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), CD8<sup>+</sup> αβ T-Zellen und γδ T-Zellen exprimiert wird (Bauer *et al.*, 1999; Groh *et al.*, 2001). Viele Liganden sind für NKG2D mittlerweile beschrieben worden. Zu den humanen NKG2D-Liganden gehören u. a. die MHC Klasse I-verwandten Proteine A und B (MICA und MICB) (Bahram *et al.*, 1994) sowie die ULBP (UL16-binding protein) Moleküle 1-5 (Cosman *et al.*, 2001; González *et al.*, 2008). MICA und MICB werden in der MHC-Region kodiert und zeigen strukturelle und sequenzielle Ähnlichkeiten (28 – 35 % Sequenzidentität) mit MHC Klasse I-Molekülen (González *et al.*, 2008). Wie MHC I-Proteine besitzen sie drei extrazelluläre Domänen (α1 α2 α3) und einen kurzen Transmembranbereich (González *et al.*, 2008). Die Proteine MICA/B haben jedoch keine Funktion in der Antigenpräsentation und assoziieren nicht mit β2-Mikroglobulin, so wie die meisten MHC I-Moleküle und deren Homologe (Bahram *et al.*, 1994; Bahram & Spies, 1996; Groh *et al.*, 1996). Von Li *et al.*, (2001) konnte der Rezeptor NKG2D im Komplex mit seinem Liganden MICA kristallisiert und so die Struktur aufgeklärt werden (Abbildung 1.10).



**Abbildung 1.10:** In (A) ist die Kristallstruktur der extrazellulären Domäne des homodimeren NKG2D-Rezeptors (blau und violett) im Komplex mit seinem Liganden MICA dargestellt (Li *et al.*, 2001). In (B) ist die Kristallstruktur des Liganden MICA gezeigt (Li *et al.*, 1999). MICA besteht aus drei extrazellulären Domänen (α1 – violett, α2 – pink, α3 – grün) und einem Transmembranbereich (nicht gezeigt). Die drei Disulfidbrücken der extrazellulären Domänen sind in gelb dargestellt, die Seitenketten der 8 Tryptophane in dunklem violett. Der N-Terminus des Proteins befindet sich in Domäne α1, der C-Terminus in α3. PDB-Einträge: (A) – 1HYR, (B) – 1B3J

Die Bindung von NKG2D durch einen seiner Liganden oder durch MICA/B auf epithelialen Tumorzellen aktiviert NK-Zellen auch in Gegenwart inhibitorischer NK-Zell-Rezeptoren und deren jeweiligen MHC Klasse I-Liganden (Bauer *et al.*, 1999). Durch die Bindung des NKG2D-Rezeptors wird eine Signalkaskade initiiert, die mit der Rekrutierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase durch

das Adapterprotein DAP10 (DNAX-aktivierendes Protein von 10 kDa) einhergeht (Wu *et al.*, 1999; 2000). Letztlich führt die Rezeptorbindung zur Tyrosin-Phosphorylierung der assoziierten Adapterproteine (Vivier & Colonna, 2006). Die induzierte Zytotoxizität geht dabei mit verschiedenen Prozessen einschließlich (a) der Neuausrichtung des Aktin-Zytoskeletts und der Bildung einer Immunsynapse zwischen NK-Zellen und Zielzellen, (b) der Neuorientierung des Golgikomplexes und der Mikrotubuli, um die lytischen Granula der NK-Zelle in Richtung der Synapse zu polarisieren und (c) der Ausschüttung des Inhaltes der lytischen Granula (Granzyme und Perforin) einher (Vivier & Colonna, 2006). Die Aufnahme der Granzyme in das Zytosol der Zielzelle wird durch das porenbildende Perforin vermittelt (Liebermann, 2003), wo es schließlich die Apoptose der Zelle über Caspase-abhängige und -unabhängige Signalkaskaden induziert.

Im Gegensatz zu anderen NK-Zell-Liganden werden MICA/B nicht konstitutiv, sondern induziert durch zellulären Stress (Groh *et al.*, 1996; 1998) oder bakterielle (Das *et al.*, 2001) bzw. virale Infektionen (Siren *et al.*, 2004) auf der Zelloberfläche exprimiert. Die Gewebeverteilung der Proteine MICA/B ist beschränkt auf intestinales Epithel, sie wurden jedoch auch auf vielen unterschiedlichen Tumorzelltypen wie humanen epithelialen Krebszellen, Melanomen, Gliomen und Leukämien nachgewiesen (Pende *et al.*, 2002; Vetter *et al.*, 2002; Friese *et al.*, 2003; Salih *et al.*, 2003). Während der Tumorentwicklung jedoch werden zunehmend weniger NKG2D-Liganden auf den Krebszellen exprimiert als Folge einer Tumorselektion (Vetter *et al.*, 2004; Carbone *et al.*, 2005), Kontaktinhibition (Zou *et al.*, 2006) oder aufgrund proteolytischer Abspaltung der Liganden (Salih *et al.*, 2002). An dieser Stelle könnten neue Therapieformen, die die Oberfläche der Krebszellen gezielt mit diesen Immunliganden markieren, ansetzen.

Die extrazelluläre Domäne des Proteins MICA wurde in dieser Arbeit zusammen mit dem tumorspezifischen Antikörperfragment B3 (siehe Kapitel 1.3.1.2) zum Design des bispezifischen artifiziellen Proteinkonstruktes B3-MICA eingesetzt.

## 1.4 Problemstellung und Ziele

Die Entwicklung neuer Behandlungsmöglichkeiten für die Krebstherapie hat in den vergangenen Jahrzehnten zunehmend an Bedeutung gewonnen. Es existieren bereits zahlreiche viel versprechende molekulare Ansätze. So konnten für Immuntoxine in Zellkulturexperimenten bzw. *in vivo* bereits hohe tumorspezifische Toxizitäten nachgewiesen werden. Viele Immuntoxine befinden sich in klinischen Testphasen, eines ist bereits für die Behandlung von T-Zell-Lymphomen in den USA zugelassen. Die Entwicklung neuer Immuntoxine, welche Eigenschaften wie eine hohe Tumorspezifität, Zytotoxizität, Stabilität und einer verminderte Immunogenität aufweisen, kann für die künftige Krebstherapie wertvolle und entscheidende Beiträge leisten.

Für das bakterielle Protein Listeriolysin O konnte bereits eine hohe zytotoxische Wirkung nachgewiesen werden. So induzierte es auch in sublytischen Konzentrationen die Apoptose von Zellen (Carrero *et al.*, 2004). Die außergewöhnlichen Eigenschaften dieses Zytolysins, wie die maximale Aktivität unter sauren (pH 5.5) Bedingungen und die Möglichkeit der Regulation dieser Aktivität durch Oxidation des intrinsischen Cysteins machten dieses Toxin zu einer interessanten und viel versprechenden toxischen Komponente in einem Immuntoxin. Durch die Verknüpfung mit einem tumorspezifischen Antikörperfragment sollte die Spezifität des Immuntoxins für Krebszellen gewähr-

leistet werden. Im Kontext der Herstellung eines neuen Immuntoxins sollte im Rahmen dieser Arbeit das Proteintoxin Listeriolysin O mit dem tumorspezifischen Antikörperfragment B3-R<sub>8</sub>CP verknüpft werden. Für die Kopplung der beiden Komponenten sollte ein bereits etabliertes polyionisches Dimerisierungsmotiv zum Einsatz kommen (Richter *et al.*, 2001). Dabei können die Proteine über entgegengesetzt geladene polyionische Fusionspeptide elektrostatisch miteinander interagieren und durch zusätzlich eingefügte Cysteine und die Ausbildung einer Disulfidbrücke kovalent miteinander verknüpft werden. So sollte zunächst eine polyionische Variante des Listeriolysin O mit einem N-terminalen Fusionspeptid, bestehend aus 8 Glutamat-Resten und einem Cystein, generiert werden. Nach der Kopplung der beiden Komponenten zum bifunktionellen Konstrukt B3-LLO sollte die zytolytische Wirkung des Konstruktes sowie des Listeriolysin O in oxidiert (weniger aktiver) und reduzierter (aktiver) Form mittels Hämolyse (Zerstörung der Membran nativer Erythrozyten) analysiert werden. An diese Analysen sollten sich im nächsten Schritt Zellkulturexperimente zur Untersuchung der zytotoxischen Wirkung auf Tumorzellen anschließen. Dabei sollten die EC<sub>50</sub>-Werte für die Zelltyp-spezifische und -unspezifische Toxizität bestimmt werden, um Aussagen zur Toxizität und Spezifität im Vergleich mit anderen Immuntoxinen treffen zu können.

Da jedoch die Aktivierung des Immunsystems und damit die Nutzung natürlicher Ressourcen des Körpers zunehmend in der Krebstherapie an Bedeutung gewinnt und sehr viel Potenzial besitzt, sollte in einem nächsten Schritt das bifunktionelle Protein B3-MICA generiert werden. MICA stellt dabei einen Liganden für den auf Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) vorkommenden aktivierenden Rezeptor NKG2D dar. Das Antikörperfragment B3-R<sub>8</sub>CP sollte wiederum die Zelltypspezifität vermitteln. Die Kopplung dieser beiden Komponenten sollte mit Hilfe der polyionischen Fusionspeptide erfolgen. Das Konzept hinter diesem bifunktionellen Konstrukt besteht in der simultanen Bindung der Tumorzellen und NK-Zellen. Dadurch sollen Letztere zu den Zielzellen rekrutiert und durch die Bindung des MICA an den aktivierenden Rezeptor der NK-Zellen gleichzeitig aktiviert werden, was letztlich zur NK-Zell-vermittelten Lyse der Zielzellen führen soll. Zunächst sollte eine polyionische Variante des MICA mit C-terminalem Fusionspeptid, bestehend aus 8 Glutamat-Resten und einem Cystein, generiert werden. Die polyionische Variante sollte anschließend im Vergleich mit MICA biophysikalisch charakterisiert werden, um einen Einfluss der polyionischen Fusion auf die Integrität des Proteins auszuschließen. Im nächsten Schritt sollte die extrazelluläre Domäne des NKG2D-Rezeptors für Bindungsstudien mit dem polyionischen MICA rekombinant hergestellt werden. Nach der Kopplung des polyionischen MICA und des tumorspezifischen Antikörperfragmentes sollte ein gemischter Zellkulturassay etabliert werden, der die simultane Kultivierung von NK-Zellen und Zielzellen und die Analyse der biologischen Aktivität des bifunktionellen Konstruktes gestattet. Weiterhin sollte der Assay die Darstellung der Aktivität der NK-Zellen hinsichtlich der Produktion von Chemokinen und Zytokinen erlauben.

---

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

Die nachfolgend aufgeführten Chemikalien (Tabelle 2.1) wurden für die Anfertigung dieser Arbeit verwendet. Sämtliche Substanzen besaßen den Reinheitsgrad (p. a.), sofern nicht anders angegeben.

Tabelle 2.1: Liste verwendeter Chemikalien

Chemikalien	Bezugsquelle
5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB)	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
5-Carboxyfluorescein-Succinimidylester	Invitrogen, Karlsruhe
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
30 % Acrylamid/0.8 % N,N'-Methylen-bisacrylamid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Aceton	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Acetonitril (HPLC grade)	Riedel-de-Haën, Seelze
Agar-Agar	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Agarose ( <i>electrophoresis grade</i> )	ICN Biomedicals, Meckenheim
Alexa Fluor® 488 C5-Maleimid	Invitrogen, Karlsruhe
Alexa Fluor® 488 5-TFP	Invitrogen, Karlsruhe
Ammoniumchlorid	Riedel-de-Haën, Seelze
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ampicillin	AppliChem, Darmstadt
Antischaummittel (Polypropylenglykol)	BASF, Ludwigshafen
BRADFORD-Reagenz	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Calciumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Coomassie Brillant Blau G250	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Chloramphenicol	AppliChem, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Di-Kaliumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Di-Natriumhydrogenphosphat · H <sub>2</sub> O	Merck KGaA, Darmstadt
Di-Natriumthiosulfat · 5H <sub>2</sub> O	Fluka Chemie AG, Buchs (Schweiz)
Dithiothreitol (DTT)	ICN Biomedicals GmbH, Meckenheim
Essigsäure (96 %ig)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethanol (96 %ig)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethidiumbromid (2,7-Diamino-10-ethyl-9-phenylphenanthridiniumbromid)	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	ICN Biomedicals GmbH, Meckenheim
Formaldehyd	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Glukose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Glutathion, oxidiert (GSSG)	AppliChem, Darmstadt

Chemikalien	Bezugsquelle
Glutathion, reduziert (GSH)	AppliChem, Darmstadt
Glycerin	Brenntag, Mühlheim
Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Guanidiniumhydrochlorid (GdmHCl), <i>C-grade</i>	Nigu Chemie GmbH, Waldkraiburg
Hefeextrakt	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Hefeextrakt (flüssig, für die Fermentation)	Ohly GmbH, Hamburg
4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-1-ethansulfonsäure (HEPES)	AppliChem, Darmstadt
Imidazol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid (IPTG)	AppliChem, Darmstadt
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt
Jodacetamid	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Kanamycin	AppliChem, Darmstadt
Kupfer-II-Chlorid	Riedel-de-Haën, Seelze
L-Arginin	Ajinomoto C. Inc., Tokyo (Japan)
L-Arginin Hydrochlorid	Ajinomoto C. Inc., Tokyo (Japan)
Magnesiumchlorid $\cdot$ 6H <sub>2</sub> O	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Magnesiumsulfat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Milchpulver, <i>blotting grade</i>	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumcarbonat, <i>rein</i>	Fluka Chemie AG, Buchs (Schweiz)
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natrium-Desoxycholat	Amresco, Ohio (USA)
Natriumdihydrogenphosphat $\cdot$ H <sub>2</sub> O	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumsulfat	Merck KGaA, Darmstadt
Natronlauge	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	AppliChem, Darmstadt
Phosphorsäure (85 %ig)	Merck KGaA, Darmstadt
Salzsäure (37 %ig)	Merck KGaA, Darmstadt
Silbernitrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Texas Red <sup>®</sup> C2-Maleimid	Invitrogen, Karlsruhe
Trichloressigsäure (TCA)	Merck KGaA, Darmstadt
Trifluoressigsäure (TFA)	Merck KGaA, Darmstadt
Tris-hydroxymethyl-aminomethan (Tris)	ICN Biomedicals GmbH, Meckenheim
Triton X-100	AppliChem, Darmstadt
Trypton	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tween 20	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen

## 2.2 Enzyme, Reagenzien und Standards

Im Rahmen dieser Dissertation wurden folgende kommerzielle Enzyme, Reagenzien und Standards verwendet.

Tabelle 2.2: Liste der verwendeten Enzyme, Reagenzien und Standards

Enzyme und Standards	Hersteller
<b>Proteasen</b>	
Thrombin	Merck KGaA, Darmstadt
<b>Restriktionsendonukleasen</b>	
<i>BspEI</i> (20 U/ $\mu$ L)	New England Biolabs, Beverly (USA)
<i>NdeI</i> (20 U/ $\mu$ L)	New England Biolabs, Beverly (USA)
<i>NdeI</i> FastDigest <sup>® 1)</sup>	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>NotI</i> (20 U/ $\mu$ L)	New England Biolabs, Beverly (USA)
<i>SaII</i> (20 U/ $\mu$ L)	New England Biolabs, Beverly (USA)
<i>XhoI</i> FastDigest <sup>® 1)</sup>	Fermentas, St. Leon-Rot
<b>sonstige Enzyme</b>	
Antarctic Phosphatase (5 U/ $\mu$ L)	New England Biolabs, Beverly (USA)
Benzonase <sup>®</sup> <i>purity grade II</i> (250 U/ $\mu$ L)	Merck KGaA, Darmstadt
Lysozym	Merck KGaA, Darmstadt
Phusion <sup>®</sup> <i>high-fidelity</i> DNA-Polymerase (2 U/ $\mu$ L)	New England Biolabs, Beverly (USA)
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase (2.5 U/ $\mu$ L)	Fermentas, St. Leon-Rot
T4-DNA-Ligase (5 U/ $\mu$ L)	Fermentas, St. Leon-Rot
<b>Reagenzien und Standards</b>	
1 kbp/100 bp-DNA-Längenstandard	New England Biolabs, Beverly (USA)
GeneRuler <sup>™</sup> 1 kbp-DNA-Längenstandard	Fermentas, St. Leon-Rot
LMW Protein-Molekulargewichts-Standard	Fermentas, St. Leon-Rot
PageRuler <sup>™</sup> <i>Prestained Protein Ladder</i>	Fermentas, St. Leon-Rot
dNTP's (10 mM)	Fermentas, St. Leon-Rot
Proteaseinhibitor-Tablette (EDTA-frei)	Roche Diagnostics, Penzberg
Rinderserumalbumin (BSA)	New England Biolabs, Beverly (USA)

<sup>1)</sup>Für FastDigest<sup>®</sup>-Enzyme wird vom Hersteller für DNA-Spaltungen 1  $\mu$ L Enzym/1  $\mu$ g DNA angegeben.

## 2.3 Antikörper

Die in der nachfolgenden Tabelle (Tabelle 2.3) aufgeführten Antikörper waren für die Anfertigung dieser Arbeit hilfreich.

Tabelle 2.3: Liste der verwendeten Antikörper

Antikörper	Klon	Bezugsquelle
anti-CD28, PE-markiert	CD28.2	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-Interleukin-8, PE-markiert	G265-8	BD Biosciences, San Jose (USA)
anti-Interferon $\gamma$	G23	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-Interferon $\gamma$ , PE-markiert	G23	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-MICA, (polyklonal)	H-300	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-MICA/B, Fluorescein-markiert	6D4	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-MICA/B, PE-markiert	6D4	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-MIP-1 $\beta$ , PE-markiert	D21-1351	BD Biosciences, San Jose (USA)
anti-NKG2D	1D11	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-NKG2D, PE-markiert	1D11	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-Phospho-Tyrosin	PY99	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-RANTES (CCL5)	205	BD Biosciences, San Jose (USA)
Isotypkontrolle IgG <sub>1</sub> ( <i>mouse</i> ), PE-markiert	-	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
<i>goat</i> -anti- <i>rabbit</i> IgG-HRP	-	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
<i>goat</i> -anti- <i>mouse</i> IgG-HRP	-	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

## 2.4 sonstige Materialien

Zusätzlich wurden folgende Materialien und Kits verwendet (Tabelle 2.4).

Tabelle 2.4: Liste der verwendeten sonstigen Materialien

sonstige Materialien	Hersteller/Bezugsquelle
Amersham ECL Plus <sup>™</sup> <i>Western Blotting Detection Reagent</i>	GE Healthcare, Freiburg
Amersham Hyperfilm ECL (Autoradiographiefilm)	GE Healthcare, Freiburg
BugBuster <sup>®</sup> <i>Protein Extraction Reagent</i>	Merck KGaA, Darmstadt
Celophanfolie für Geltrocknung	Helmut Schmidt GmbH, Königswinter
Dialyseschläuche Spectra/Por <sup>®</sup> MWCO 3 kDa und 6-8 kDa	Spectrum Laboratories Inc., Eindhoven (Niederlande)
Dialyseschlauchklemmen	Spectrum Laboratories Inc., Eindhoven (Niederlande)
Glukosesensorstäbchen	Merck KGaA, Darmstadt
Hammelblut ( <i>sheep blood</i> )	Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Deerfield (USA)
ISOPORE <sup>™</sup> Membranfilter ( $\emptyset$ 0.4 $\mu$ m)	Millipore, Schwalbach
Kodak <sup>®</sup> Entwickler- und Fixierlösung für Autoradiographiefilme (Konzentrat)	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Microfuge <sup>®</sup> Tube	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Parafilm	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
pH-Indikatorstäbchen	Merck KGaA, Darmstadt

sonstige Materialien	Hersteller/Bezugsquelle
Rotilabo <sup>®</sup> Spritzenfilter (Ø 0.45 µM)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Vivaspin 500 Zentrifugalkonzentratoren, MWCO 5 kDa	Sartorius GmbH, Göttingen
VivaFlow 200 Membran, MWCO 5 kDa	Sartorius GmbH, Göttingen
Zentrifugalkonzentratoren AMICON Ultra-15	Millipore, Schwalbach
ZipTips <sup>®</sup> C <sub>4</sub> Pipettenspitzen	Millipore, Schwalbach
<b>Kits</b>	
BD Cytotfix/Cytoperm <sup>™</sup> Kit	BD Biosciences, San Jose (USA)
GeneJET <sup>™</sup> Plasmid Miniprep Kit	Fermentas, St. Leon-Rot
QIAquick <i>Gel Extraction</i> Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick <i>PCR Purification</i> Kit	Qiagen, Hilden
Zero Blunt <sup>®</sup> TOPO <sup>®</sup> PCR Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe

## 2.5 Geräte und Zubehör

Zur Anfertigung dieser Doktorarbeit wurden die in der nachfolgenden Tabelle aufgeführten Geräte verwendet.

Tabelle 2.5: Liste der verwendeten Geräte

Geräte und Zubehör	Hersteller
<b>Absorptionsspektrometer</b>	
Ultrospec 3000 und 4000 UV/VIS Spektrophotometer	GE Healthcare, Freiburg
Halbmikroküvette QS (d = 1 cm)	Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim
Mikroküvette QS (d = 1 cm)	Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim
<b>Autoklaven</b>	
GTA 50	Fritz Gössner, Hamburg
Varioklav <sup>®</sup>	H + P Labortechnik, Oberschleißheim
<b>Blotting-Apparatur</b>	
Semidry Blotapparatur Hoefer SemiPhor	GE Healthcare, Freiburg
Nitrozellulose Membran	Whatman GmbH, Dassel
Blotting Papier	Hahnemühle FineArt GmbH, Dassel
<b>CD-Spektrophotometer</b>	
Jasco J-810 Spektropolarimeter	Jasco GmbH, Groß-Umstadt
Absorptionsküvetten, (d = 0.1 , 0.5 , 1 mm, 1 cm)	Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim
<b>Chromatographie-Anlagen</b>	
Äkta <i>explorer</i>	GE Healthcare, Freiburg
Äkta <i>purifier</i>	GE Healthcare, Freiburg
Fraktionssammler Frac-900 sowie Prozesssteuerung mittels	GE Healthcare, Freiburg

Geräte und Zubehör	Hersteller
UNICORN™ Control Software (V.3)	
<b>Chromatographiesäulen</b>	
<i>Ionenaustauschchromatographie</i>	
HiTrap™ SP FF 5 mL CV	GE Healthcare, Freiburg
HiTrap™ SP HP 1 mL und 5 mL CV	GE Healthcare, Freiburg
HiTrap™ Q HP 1 mL und 5 mL CV	GE Healthcare, Freiburg
<i>Affinitätschromatographie</i>	
Glutathion Sepharose FF 5 mL CV	GE Healthcare, Freiburg
Ni-NTA HisTrap™ HP 1 mL und 5 mL CV	GE Healthcare, Freiburg
<i>Gelfiltration</i>	
Superdex 75, ( <i>prep grade</i> ) & analytisch	GE Healthcare, Freiburg
PD-10 <i>desalting column</i>	GE Healthcare, Freiburg
<b>Elektroporationsgerät</b>	
Gene Pulser II	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Elektroporationsküvetten, 2 mm	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
<b>Fermenter</b>	
Biostat ED (10 L Arbeitsvolumen) mit digitalem Mess- und Regelsystem C-DCU und Prozessleitsystem MCF5win	Sartorius BBI Systems GmbH, Melsungen
<b>Fluoreszenzspektrophotometer</b>	
Fluoromax-3	ISA Instrument, S.A. Inc., München
Peltierelement LFI-3751	Wavelength Electronics, Broadstairs (UK)
Halbmikrofluoreszenzküvette QS (rührbar, mit Stopfen)	Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim
Ultra-Mikrofluoreszenzküvette QS	Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim
<b>Gaulin-Hochdruckhomogenisator</b>	
Micron Lab 40	APV, Lübeck
Lab 60	APV, Lübeck
<b>Gelelektrophoresegeräte</b>	
SE 250 <i>mighty small II mini-vertical unit</i>	GE Healthcare, Freiburg
EPS 200	GE Healthcare, Freiburg
EPS 600	GE Healthcare, Freiburg
GNA-100 <i>submarine unit</i>	GE Healthcare, Freiburg
<b>Homogenisator</b>	
Ultra-Turrax T25	Janke & Kunkel, Staufen
<b>HPLC</b>	
Gynkotek	Dionex, Idstein
Dionex Pumpenserie P 580	Dionex, Idstein
Probengeber GINA50	Dionex, Idstein
UV/VIS - Detektor UVD 170S/340S	Dionex, Idstein
C <sub>4</sub> Säule - Jupiter 300	Phenomenex Ltd., Aschaffenburg
C <sub>18</sub> Säule - Jupiter 300	Phenomenex Ltd., Aschaffenburg

Geräte und Zubehör	Hersteller
<b>Inkubatoren</b>	
Minicoldlab 2203	Boehringer Ingelheim GmbH, Mannheim
<b>Laminarflowbox</b>	
HERA <i>safe</i>	Heraeus, Hanau
<b>pH-Messgerät</b>	
pH-Meter pH526	WTW GmbH, Weilheim
<b>Pumpen</b>	
Schlauchquetschpumpe 313U	Watson Marlow GmbH, Rommerskirchen
Pumpe P1	GE Healthcare, Chalfont St. Giles (UK)
<b>Schüttelinkubatoren</b>	
Certomat <sup>®</sup> BS-T	Sartorius BBI Systems GmbH, Melsungen
<b>Thermocycler</b>	
Mastercycler Gradient <sup>®</sup>	Eppendorf AG, Hamburg
<b>Thermomixer</b>	
Thermomixer <i>compact</i>	Eppendorf AG, Hamburg
Thermomixer <i>comfort</i>	Eppendorf AG, Hamburg
<b>UV-Transilluminator</b>	
UV-Transilluminator	VWR GmbH, Darmstadt
<b>Waagen</b>	
Feinanalysenwaage KB BA 100	Sartorius GmbH, Göttingen
Waage, Typ BP 2100S	Sartorius GmbH, Göttingen
Waage, Typ, BP 4100S	Sartorius GmbH, Göttingen
<b>Zentrifugen &amp; Rotoren</b>	
Avanti <sup>™</sup> J-20	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Avanti <sup>™</sup> J-25	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Biofuge <i>fresco</i>	Heraeus, Hanau
Biofuge <i>pico</i>	Heraeus, Hanau
Optima <sup>™</sup> TLX Ultrazentrifuge	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Optima <sup>™</sup> XL-A analytische Ultrazentrifuge	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
SpeedVac RC10.10	GFL <sup>®</sup> , Burgwedel
Rotor JA-20	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
JA-30.50 Ti	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
JLA-8.1000	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
JLA-16.250	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
TLA 100.3	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
An50Ti	Beckman Coulter GmbH, Krefeld

Neben den hier aufgeführten Geräten wurden außerdem Geräte der Standardlaborausstattung verwendet. In Tabelle 2.12 sind die für die Zellkultur sowie zellbiologischen Methoden verwendeten Geräte aufgeführt.

## 2.6 Bakterien und Plasmide

Für die Erstellung der Plasmidkonstrukte und für die rekombinante Proteinexpression wurden die in den nachfolgenden Tabellen (Tabelle 2.6 und Tabelle 2.7) aufgeführten Bakterienstämme und Plasmide verwendet.

Tabelle 2.6: Liste der verwendeten Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Bezugsquelle
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>E. coli</i> B F <sup>-</sup> <i>ompT gal hsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) dcm (DE3)	Merck KGaA, Darmstadt
<i>E. coli</i> BL21-CodonPlus <sup>®</sup> (DE3)-RIL	<i>E. coli</i> B F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) dcm <sup>+</sup> Tet <sup>r</sup> <i>gal λ</i> (DE3) <i>endA Hte [argU ileY leuW Cam<sup>r</sup>]</i>	Stratagene, Heidelberg
<i>E. coli</i> XL10 Gold <sup>®</sup> Kan <sup>r</sup>	<i>E. coli</i> Tet <sup>r</sup> Δ ( <i>mcrA</i> )183 Δ( <i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i> )173 <i>endA1, supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>) Tn5 (Kan<sup>r</sup>) Amy]</i>	Stratagene, Heidelberg

Tabelle 2.7: Liste der verwendeten Plasmide

Konstrukt	codiertes Protein	Bezugsquelle
pB3-V <sub>L</sub> (Derivat des pULI 39-1 (Reiter <i>et al.</i> 1994))	B3-V <sub>L</sub> (V <sub>L</sub> -Domäne des monoklonalen Antikörpers B3)	K.-G. Stubenrauch Universität Halle
pB3-V <sub>H</sub> -R <sub>8</sub> CP (Derivat des pYR 38-2 (Reiter <i>et al.</i> , 1994))	B3-V <sub>H</sub> -R <sub>8</sub> CP (V <sub>H</sub> -Domäne des monoklonalen Antikörpers B3, C-terminal erweitert um R <sub>8</sub> CP-codierende Sequenz)	K.-G. Stubenrauch Universität Halle
pCR Blunt II TOPO <sup>®</sup>	Klonierungsvektor zur direkten Ligation von <i>blunt end</i> PCR-Fragmenten	Invitrogen, Karlsruhe
pET29b-LLO	Wildtyp-Listeriolysin O mit C-terminalem His <sub>6</sub> -tag	D. Portnoy, DoMCB, Berkeley (USA)
pGEX-4T1-E <sub>8</sub> C-PE38	<i>Pseudomonas</i> Exotoxin 38, Konstrukt mit N-terminaler GST- und E <sub>8</sub> C-Fusion; zwischen PE38 und GST befindet sich eine artifizielle Thrombinschnittstelle	Martin Kleinschmidt, Universität Halle
pGEX-4T1-E <sub>8</sub> C-LLO	Wildtyp-Listeriolysin O mit N-terminaler Erweiterung um 8 Glutamate und 1 Cystein	diese Arbeit
pET22b-MICA	MICA mit C-terminalem His <sub>6</sub> -tag	R. K. Strong, Fred

Konstrukt	codiertes Protein	Bezugsquelle
pET22b-MICA-E <sub>8</sub> C	MICA, C-terminal erweitert um Sequenz, die für die Aminosäuren GSCE <sub>8</sub> P codiert (anstelle des His <sub>6</sub> -tag)	Hutchinson Cancer Research Center, Seattle (USA) diese Arbeit
pET22b-NKG2D	Extrazelluläre Domäne des Rezeptors NKG2D	R. K. Strong, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle (USA)

Die Plasmide pET29b-LLO und pGEX-4T1-E<sub>8</sub>C-PE38 dienten als Ausgangskonstrukte zur Herstellung des Konstruktes pGEX-4T1-E<sub>8</sub>C-LLO. Das Plasmid pET22b-MICA diente neben der Expression des Proteins MICA auch als Ausgangskonstrukt für die Klonierung des Plasmidkonstruktes pET22b-MICA- E<sub>8</sub>C.

## 2.7 Oligonukleotide

Für die molekularbiologischen Arbeiten wurden die in Tabelle 2.8 aufgeführten Oligonukleotide verwendet.

Tabelle 2.8: Liste der verwendeten Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz
<b>Klonierungsprimer</b>	
fw-LLO-BspEI_2	5'-TCT CCG GAA TGA AGG ATG CAT C-3'
rev-LLO-SalI	5'-TTC AGT CGA CGA ATT CGG ATC CTT ATT AG-3'
MICA_fw_E <sub>8</sub> C	5'-GAT ATA CAT ATG GAG CCC CAC AG-3'
MICA_rev_E <sub>8</sub> C	5'-AT CTC GAG TTA TCA TGG CTC TTC TTC TTC TTC TTC TTC TTC ACA GGA TCC AGA GGG CAC AGG GTG AGT G-3'

Die Planung der Klonierungsprimer erfolgte mit dem Programm *Gene Runner*. Die Primer für die Klonierung von MICA-E<sub>8</sub>C wurden Hydrogel-gereinigt, die Primer zur Klonierung von E<sub>8</sub>C-LLO HPLC-gereinigt von der Firma MWG Biotech AG (Martinsried) bezogen. Die Sequenzierung der Plasmide erfolgte ebenfalls durch die Firma MWG Biotech AG (Martinsried).

## 2.8 Zusammensetzung häufig verwendeter Puffer und Lösungen

Im nachfolgenden Abschnitt sind die Zusammensetzungen häufig im Labor genutzter Puffer und Lösungen beschrieben.

Tabelle 2.9: Liste der verwendeten Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
<b>Puffer für die Molekularbiologie</b>	
Laufpuffer Agarose-Gelelektrophorese: TAE (50-fach)	1 M Tris, 2 M Essigsäure, 0.5 M EDTA, pH 8.0 (für die Herstellung und Elektrophorese von Agarosegelen als 1-fach Puffer verwendet)
DNA-Probenauftragspuffer (5-fach)	50 % (v/v) Glycerin, 50 % (v/v) TAE-Puffer (1-fach), 0.05 % (w/v) Bromphenolblau, pH 7.2
<b>Western Blot Puffer</b>	
Blotting Puffer	20 mM Tris, 150 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol, 0.02 % (w/v) SDS, pH 8.3
Western Blot Inkubations- und Waschlösung (1-fach TBT)	10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.2 % Tween 20, pH 7.4
<b>Puffer und Lösungen für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese</b>	
SDS-Probenauftragspuffer (5-fach) nicht reduzierend (Laemmli, 1970)	250 mM Tris, 5 % (w/v) SDS, 50 % Glycerin, 0.005 % Bromphenolblau, pH 8.0
SDS-Probenauftragspuffer (5-fach) reduzierend	wie oben, zusätzlich 5 % (v/v) 2-Mercaptoethanol
SDS-Gelelektrophoresepuffer (Laufpuffer, 5-fach)	125 mM Tris, 1.25 M Glycin, 17.5 mM SDS, pH 8.3
Sammelgelpuffer (4-fach)	0.5 M Tris, 0.8 % (w/v) SDS, pH 6.8
Trenngelpuffer (4-fach)	1.5 M Tris, 0.8 % (w/v) SDS, pH 8.8
Es wurden Lösungen nach Fairbanks <i>et al.</i> (1971) verwendet, um Proteinbanden in SDS-Polyacrylamidgelen zu färben.	
Lösung A	25 % (v/v) Isopropanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 0.05 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau G 250
Lösung B	10 % (v/v) Isopropanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 0.005 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau G 250
Lösung C	10 % (v/v) Essigsäure 0.002 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau G 250
Entfärbelösung	10 % (v/v) Essigsäure
Trocknerlösung	10 % (v/v) Glycerin

Zum Trocknen von Gelen wurden diese für mindestens 24 h in Trocknerlösung inkubiert. Anschließend wurden sie mit in 10 % (v/v) Glycerin getränkten Folien auf einen Rahmen gespannt und für mindestens 3 Tage an der Luft getrocknet.

In dieser Arbeit wurden 8 %ige, 10 %ige, 12 %ige, 15 %ige und 18 %ige SDS-Gele verwendet. Das Trenngel wurde mit einem Sammelgel überschichtet. Die Zusammensetzung für 3 SDS-Polyacrylamidgele kann nachstehender Tabelle (Tabelle 2.10) entnommen werden.



Bezeichnung	Zusammensetzung
autoklaviert wurde, wurden alle Medien und Lösungen separat autoklaviert.	
Hauptkulturvollmedium	50 g/L Hefeextrakt, 0.5 g/L Ammoniumchlorid, 1 mL Antischaummittel (Menge für 6 L in 5 L Wasser (bidest.) gelöst)
weitere Lösungen	5 g/L Glukose (0.25 L), 11 g/L K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0.5 L), 0.68 g/L MgSO <sub>4</sub> (0.25 L), 10 %ige H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (0.5 L), 10 %ige NaOH (0.5 L), bidest. Wasser (0.5 L)
Feedinglösung (2 L)	30 % (w/v) Hefeextrakt, 25 % (v/v) Glycerin
Unmittelbar vor Kultivierungsbeginn wurden die Glukose-, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -, MgSO <sub>4</sub> -Lösungen, 350 mL Wasser und 6 mL 100 mg/mL Ampicillin steril in den Reaktor gegeben.	

## 2.10 Materialien für die Zellkultur

In der nachfolgenden Tabelle (Tabelle 2.12) sind sämtliche der bei Zellkulturversuchen verwendeten Lösungen und Chemikalien sowie Medien und Seren aufgeführt. Tabelle 2.13 listet die in der Zellkultur benötigten Geräte auf und Tabelle 2.14 gibt eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien.

Tabelle 2.12: Liste der verwendeten Medien, Seren, Lösungen und Chemikalien

Medien, Seren, Lösungen und Chemikalien	Hersteller/Bezugsquelle
<b>Chemikalien</b>	
3,3'-Dioctadecyloxacarboxyanin-perchlorat (Dio)	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
2-Mercaptoethanol (getestet für die Zellkultur)	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Brefeldin A	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Folsäure (getestet für die Zellkultur)	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Interferon $\gamma$	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Ionomycin	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
myo-Inositol (getestet für die Zellkultur)	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA)	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
poly-D-Lysin	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Propidiumjodid	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
<b>Seren</b>	
fötale Kälberserum, hitzeinaktiviert (FBS)	Invitrogen, Karlsruhe
fötale Kälberserum, nicht hitzeinaktiviert (FBS)	Invitrogen, Karlsruhe
Pferdeserum, nicht hitzeinaktiviert (HS)	Lonza GmbH, Köln
<b>Medien</b>	
alpha-MEM ohne Ribonukleoside und Desoxyribonukleoside	Lonza GmbH, Köln

Medien, Seren, Lösungen und Chemikalien	Hersteller/Bezugsquelle
D-MEM mit 4.5 g/L Glucose, Natrium-Pyruvat, Pyridoxin	Invitrogen, Karlsruhe
D-MEM mit 4.5 g/L Glukose, Natrium-Pyruvat	Lonza GmbH, Köln
RPMI 1640 Medium ( <i>Dutch Modification</i> )	Invitrogen, Karlsruhe
<b>Lösungen</b>	
Antibiotics/Antimycotics (100×)	PAA, Pasching (Österreich)
Cytofix	BD Biosciences, San Jose (USA)
Cytoperm	BD Biosciences, San Jose (USA)
Dulbecco's PBS (mit Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup> )	Invitrogen, Karlsruhe
FACSFlow	Becton Dickinson, Heidelberg
FACSClean	Becton Dickinson, Heidelberg
FACSRinse	Becton Dickinson, Heidelberg
Gentamicin (10 mg/mL)	Invitrogen, Karlsruhe
GlutaMAX I-Supplement (100×)	Invitrogen, Karlsruhe
ProLong <sup>®</sup> Gold <i>antifade</i> Reagenz mit DAPI	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin-EDTA-Fertiglösung (0.5 g/L Trypsin, 0.2 g/L EDTA)	Invitrogen, Karlsruhe
Trypan Blau Lösung (0.4 % (w/v))	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
<b>sonstige Lösungen</b>	
Folsäure-Stammlösung	2 mM in PBS, sterilfiltriert
Mercaptoethanol-Stammlösung	100 mM in PBS, sterilfiltriert
myo-Inositol-Stammlösung	100 mM in PBS, sterilfiltriert
Paraformaldehyd-Lösung	4 % (w/v) in PBS
Propidiumjodid-Stammlösung	50 µg/mL gelöst in H <sub>2</sub> O bidest.
Resuspensionspuffer	10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 5 mM CaCl <sub>2</sub> , pH 7.4, sterilfiltriert
Waschpuffer	PBS/3 % FBS (v/v)

Tabelle 2.13: Liste der verwendeten Gerätschaften

Geräte und Zubehör	Hersteller/Vertrieb
accu-jet <sup>®</sup> Pipettierhilfe	Brand GmbH, Wertheim
Biofuge <i>fresco</i>	Heraeus, Hanau
<i>Cryo 1 °C freezing container</i>	NALGENE <sup>™</sup> , Neerijse (Belgien)
Deckgläschen, rund	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Durchflusszytometer FACS <i>Calibur</i> mit Rechner und Steuerungssoftware (CellQuest Pro)	Becton Dickinson, Heidelberg
Flowbox HERAsafe	Heraeus, Hanau
Mikroskop Axiovert 200M mit HBO-Lampe 100 und dazugehörigen Filtersätzen	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mikroskop TELAVAL 3	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Spritzenvorsatzfilter (Ø 0.2 µM)	NALGENE <sup>™</sup> , Neerijse (Belgien)
VACCU Hand Controller mit Pumpe und	Vaccubrand GmbH, Wertheim

Geräte und Zubehör	Hersteller/Vertrieb
Absaugflasche	
Varioklav <sup>®</sup> Dampfsterilisator Typ 250T	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Wasserbad Typ 1092	GFLmbH, Burgwedel
Zählkammer (Neubauer-Kammer)	Brand GmbH, Wertheim
Zellinkubator HERAcell	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Universal 32 R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
<b>Kulturgefäße, Testplatten und Pipettenspitzen</b>	
Kammerdeckgläser ( <i>chamber slides</i> ): 0.8 cm <sup>2</sup>	Nunc <sup>™</sup> GmbH & Co. KG, Langensfeld
Kryoröhrchen: 2 mL, verschraubbar	Greiner, Frickenhausen
Serologische Pipetten: 2 mL, 5 mL, 10 mL, 25 mL, 50 mL	TPP <sup>®</sup> , Trasadingen (Schweiz)
Zellkulturflaschen: 25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup>	TPP <sup>®</sup> , Trasadingen (Schweiz)
Zellkulturtestplatten: 6, 12 und 24 <i>wells</i>	TPP <sup>®</sup> , Trasadingen (Schweiz)
poly-D-Lysin-beschichtete Zellkulturtestplatten: 6 <i>wells</i>	Nunc <sup>™</sup> GmbH & Co. KG, Langensfeld

Tabelle 2.14: Liste der verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Spezifikation	ATCC-Nr.	Medium
MCF7	humane Brustkrebszellen	HTB-22	RPMI 1640 Medium (Dutch Modification) + 10 % (v/v) FBS + 1 % (v/v) GlutaMAX I + 0.5 % (v/v) Gentamicin
NK92 MI	Natürliche Killerzellen, Interleukin-2-unabhängig	CRL-2408	alpha-MEM ohne Ribonukleoside und Desoxyribonukleoside + 12.5 % (v/v) FBS (nicht hitzeinaktiviert) + 12.5 % (v/v) HS (nicht hitzeinaktiviert) + 1 % (v/v) GlutaMAX I + 1 % (v/v) Antibiotics/Antimycotics 0.2 mM myo-Inositol 0.1 mM 2-Mercaptoethanol 0.02 mM Folsäure
HeLa	humane Gebärmutterhalskrebs- zellen	CCL-2	D-MEM mit 4.5 g/L Glukose und Natrium- Pyruvat + 10 % (v/v) FBS + 1 % (v/v) GlutaMAX I + 0.5 % (v/v) Gentamicin
SKBR-3	humane Brustkrebszellen	HTB-30	D-MEM mit 4.5 g/L Glukose und Natrium- Pyruvat + 10 % (v/v) FBS + 1 % (v/v) GlutaMAX I + 0.5 % (v/v) Gentamicin

Zelllinie	Spezifikation	ATCC-Nr.	Medium
A431	humane Hautkrebszellen	CRL-1555	D-MEM mit 4.5 g/L Glukose und Natrium-Pyruvat + 10 % (v/v) FBS + 1 % (v/v) GlutaMAX I + 0.5 % (v/v) Gentamicin
K-562	humane Lymphoblasten (chronisch myeloische Leukämie)	CCL-243	RPMI 1640 Medium (Dutch Modification) + 10 % (v/v) FBS + 1 % (v/v) GlutaMAX I + 0.5 % (v/v) Gentamicin
HT-29	humane Dickdarmkrebszellen	HTB-38	D-MEM mit GlutaMAX I, 4.5 g/L Glukose, Natrium-Pyruvat, Pyridoxin + 10 % (v/v) FBS + 0.5 % (v/v) Gentamicin

## 2.11 Software

Für die Anfertigung dieser Arbeit waren nachfolgend gelistete Computerprogramme sehr nützlich.

Tabelle 2.15: Liste der genutzten Programme

Programm	Bezugsquelle
CD Pro	Colorado State University
CellQuest Pro	Becton Dickinson, Heidelberg
CorelDRAW 9	Corel, Unterschleißheim
Corel Photo Paint 9	Corel, Unterschleißheim
Gene Runner 3.05	Hastings Software, Inc.
Microsoft® Office	Microsoft®
Pymol 0.99rc6	DeLano Scientific LLC
Sigma Plot 8.0	Jandel/SPSS, Inc.
UNICORN V.3	GE Healthcare, Chalfont St. Giles (UK)

## 2.12 Molekularbiologische Methoden

### 2.12.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Für die Präparation von Plasmid-DNA (pDNA) nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim & Doly, 1979) wurde das GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit von Fermentas benutzt.

Dazu wurden 5 mL einer *E. coli*-Übernachtskultur nach den Angaben des Herstellers aufgearbeitet. Dadurch erhält man reine pDNA in Konzentrationen von ca. 100 ng/μL. Bis zur weiteren Verwendung wurde die pDNA bei -20 °C gelagert. Plasmide, welche sequenziert werden sollten, wurden für 30 min in der SpeedVac RC10.10 zentrifugiert, um das Volumen einzuengen.

### 2.12.2 Agarosegelelektrophorese

Sowohl für analytische als auch für präparative Zwecke wurden 1 %ige (w/v) Agarosegele verwendet, welche DNA-Moleküle mit einer Länge von 0.5 bis 10 kb auftrennen. Zur Herstellung der Gele und als Laufpuffer für die Elektrophorese wurde TAE-Puffer (1-fach) verwendet. Die DNA-Proben wurden mit ¼ Volumen DNA-Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen aufgetragen. In einer horizontalen Gelelektrophoresekammer (GNA-100 *submarine unit*) erfolgte bei einer Spannung von 100 V, einer Stromstärke von 200 mA und einer Laufzeit von 40 - 70 min die Auftrennung der DNA-Fragmente. Nach der Elektrophorese wurden die Agarosegele 30 min in einer Ethidiumbromid-Lösung (0.5 µg/mL in 1-fach TAE-Puffer) inkubiert, wobei dieser Fluoreszenzfarbstoff in die DNA interkaliert (Maniatis *et al.*, 1975). Die mit Ethidiumbromid gefärbten DNA-Banden konnten anschließend unter UV-Licht detektiert werden.

### 2.12.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Position der mit Ethidiumbromid gefärbten DNA-Banden wurde unter langwelligem UV-Licht durch Schnitte mit einem Skalpell markiert. Um den mutagenen Einfluss der Strahlung zu minimieren, wurden die Banden im Anschluss ohne UV-Licht aus dem Agarosegel geschnitten. Die DNA-Extraktion aus dem Gel erfolgte mit dem QIAquick® *Gel Extraction Kit* von Qiagen.

### 2.12.4 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die DNA spezifisch zumeist an 4 - 8 bp langen Erkennungssequenzen schneiden. Die Spaltungen von DNA mit Restriktionsendonukleasen, die stets nach den Angaben des Herstellers durchgeführt wurden, erfolgten sowohl zu analytischen als auch zu präparativen Zwecken. Das nachfolgende Pipettierschema zeigt einen typischen analytischen endonukleolytischen Verdau.

Reaktionsansatz:		Endkonzentration
DNA	10 µL	
Restriktionspuffer (10-fach)	1.5 µL	1-fach
Restriktionsenzym (20 U/µL)	1 µL	1.33 U/µL
1 mg/mL BSA (wenn nötig)	1.5 µL	100 µg/mL
H <sub>2</sub> O (bidest.)	1 -2.5 µL	

Für präparative Zwecke wurde der Ansatz vervierfacht. Bei den FastDigest®-Enzymen wurde 1 µL Enzym mit dem entsprechenden Reaktionspuffer pro eingesetztem µg DNA verwendet. Die gespaltene DNA wurde durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, analysiert und bei präparativen Ansätzen aus dem Gel extrahiert. Präparativ verdaute, linearisierte Plasmid-DNA wurde im Anschluss an die Gelextraktion mit Antarctic Phosphatase nach Herstellerangaben inkubiert, um die Phosphatgruppen am 5' und 3'-Ende abzuspalten und somit eine Selbstligation der DNA zu unterbinden. Das Enzym wurde durch Inkubation des Ansatzes für 30 min bei 65 °C inaktiviert. Die Konzentration der

verdauten Fragmente wurde mittels UV/VIS-Spektroskopie bestimmt. Näherungsweise lässt sich die Konzentration durch folgenden Zusammenhang ermitteln (1).

$$(1) \quad OD_{260 \text{ nm}} = 1 \quad \text{entspricht } 50 \mu\text{g/mL (ds)DNA}$$

### 2.12.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion lassen sich DNA-Abschnitte aus einem DNA-Strang (*Template*) amplifizieren (Mullis *et al.*, 1986). In einer zyklischen Abfolge bestehend aus Strang-Trennung, Anlagerung der Primer (*annealing*) und Verlängerung (*extension*) wird unter Verwendung einer temperaturstabilen Polymerase eine Anreicherung des gewünschten DNA-Fragmentes erreicht. Der nachfolgende PCR-Reaktionsansatz wurde sowohl zur Amplifikation von LLO-Fragmenten als auch zur Amplifikation von MICA-E<sub>8</sub>C-Fragmenten verwendet.

Reaktionsansatz:		Endkonzentration
<i>Pfu</i> Reaktionspuffer (10-fach)	2.5 µL	1-fach
<i>Pfu</i> -Polymerase <sup>1)</sup>	1 µL	0.05 U/µL
dNTP Mix (je 10 mM)	0.5 µL	200 µM
Template (100 ng/µl) <sup>2)</sup>	10 µL	10 ng/µL
5'-Oligonukleotid (10 pmol/µL) <sup>3)</sup>	1 µL	4 pmol/µL
3'-Oligonukleotid (10 pmol/µL) <sup>3)</sup>	1 µL	4 pmol/µL
DMSO (100 %) <sup>4)</sup>	0.75 µL	3 %
steriles H <sub>2</sub> O bidest.	33.25 - 34 µL	

<sup>1)</sup> Für die Amplifikation von LLO-Fragmenten wurde die Phusion<sup>®</sup> *high-fidelity* DNA-Polymerase mit entsprechendem Reaktionspuffer verwendet.

<sup>2)</sup> Template zur Amplifikation von LLO-Fragmenten: pET29b-LLO; zur Amplifikation von MICA-E<sub>8</sub>C-Fragmenten: pET22b-MICA

<sup>3)</sup> 5'- und 3'-Oligonukleotide zur Amplifikation von LLO-Fragmenten: fw-LLO-BspEI\_2 und rev-LLO-Sall; 5'- und 3'-Oligonukleotide zur Amplifikation von MICA-E<sub>8</sub>C-Fragmenten: MICA\_fw\_E<sub>8</sub>C und MICA\_rev\_E<sub>8</sub>C

<sup>4)</sup> DMSO wurde nur der PCR zur Amplifikation von MICA-E<sub>8</sub>C-Fragmenten zugesetzt.

Für mehrere PCR-Reaktionen wurde ein Mastermix pipettiert.

Tabelle 2.16: Temperatur-Programm für die Polymerase Kettenreaktion

Zyklus	Schritt	Zeit	Temperatur
1. Zyklus	Denaturierung	5 min	95 °C
2. - 30. Zyklus	Denaturierung	1.5 min	95 °C
	<i>annealing</i> der Primer	1 min	55.3 bzw. 54.4°C <sup>1)</sup>
	<i>extension</i>	2.5 min	72 °C
31. Zyklus	finale <i>extension</i>	10 min	72 °C

<sup>1)</sup> Der Primer-spezifischen T<sub>m</sub>-Werte wurden mit dem Programm *Gene Runner* bestimmt und die *annealing*-Temperaturen für die PCR darauf abgestimmt. Zur Amplifikation von LLO-Fragmenten: 55.3 °C; zur Amplifikation von MICA-E<sub>8</sub>C-Fragmenten: 54.4 °C

Die durch Polymerase Kettenreaktion entstandenen PCR-Fragmente wurden mittels Agarosegelelektrophorese analysiert. Für nachfolgende Ligationen wurde der PCR-Reaktionsansatz mit dem QIAquick *PCR Purification* Kit von Qiagen nach den Angaben des Herstellers gereinigt. Bei der Amplifikation von LLO-Fragmenten (pET29b-LLO) wurden mit Hilfe der 5'- und 3'-Oligonukleotide (Primer) am 5'-Ende eine *BspEI*- und am 3'-Ende eine *Sall*- Restriktionsschnittstelle eingefügt. Bei der Amplifikation von MICA-E<sub>8</sub>C-Fragmenten aus dem pET22b-MICA-Vektor wurde mittels des 3'-Oligonukleotides eine DNA-Sequenz eingefügt, welche für die Aminosäuren GSCE<sub>8</sub>P codiert und eine *XhoI*- Schnittstelle besitzt.

### 2.12.6 TOPO-Klonierung

Bei der TOPO-Klonierung wurde das Zero Blunt<sup>®</sup> TOPO<sup>®</sup> PCR Cloning Kit von Invitrogen nach den Angaben des Herstellers verwendet. Der linearisierte TOPO-Vektor besitzt an den 3'-Vektorenden kovalent gebundene Topoisomerasen in Form von Tyrosyl-Intermediaten. Die Topoisomerase katalysiert die Verknüpfung der 5'-OH-Gruppe des PCR-Fragmentes mit den 3'-Phosphaten der Vektorenden. Auf diese Weise ist es ohne Zugabe von Ligase möglich, PCR-Produkte *blunt end* in den TOPO-Vektor zu klonieren.

Die TOPO-Klonierung wurde in dieser Arbeit genutzt, um LLO-PCR-Fragmente sowie MICA-E<sub>8</sub>C-Fragmente in den TOPO-Vektor zu ligieren.

### 2.12.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation wurden linearisierte Plasmid-DNA und DNA-Fragmente (*Insert*) verwendet. Die *Inserts* wurden nach der PCR in einen TOPO-Vektor kloniert und analog zur Plasmid-DNA mit den gleichen Restriktionsendonukleasen verdaut. Für die Ligationsansätze wurden 50 ng Plasmid-DNA verwendet. In Abhängigkeit des Größenverhältnisses (bp) zwischen *Insert* und Vektor wurde ein 5-facher bzw. 7.5-facher Überschuss an *Insert* gegenüber Vektor für die Ligation eingesetzt. Als Kontrolle der Vektor-Religation diente ein Reaktionsansatz ohne *Insert*.

Reaktionsansatz (5-fach <i>Insert</i> ):	Endkonzentration	
Plasmid-DNA (Vektor)	1 µL	
<i>Insert</i>	2 µL	
Ligase-Puffer (10-fach)	0.8 µL	1-fach
T4-DNA-Ligase	1 µL	0.625 U/µL
steriles H <sub>2</sub> O bidest.	3.2 µL	

Die Ligationsansätze wurden für 16 h bei 4 °C im Thermomixer *comfort* inkubiert. Im Anschluss wurden jeweils 2.5 µL des Ligationsansatzes in *E. coli* XL 10 Gold<sup>®</sup> Kan<sup>r</sup> transformiert (2.12.10.4).

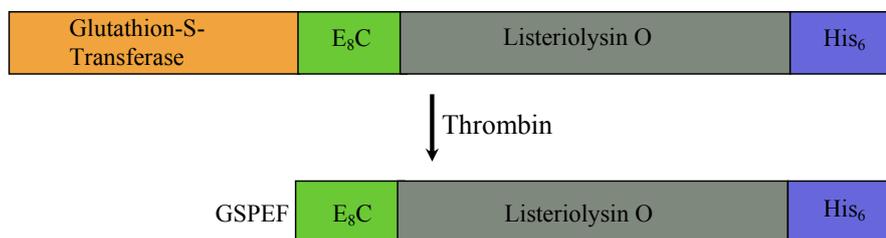
## 2.12.8 Sequenzierung und Synthese von Oligonukleotiden

Die Sequenzierung von Plasmiden und die Synthese von Oligonukleotiden wurden ausschließlich durch die Firma MWG Biotech AG (Martinsried) ausgeführt.

## 2.12.9 Konstruktion der Expressionsvektoren

### Konstruktion des Expressionsvektors pGEX-4T1-E<sub>8</sub>C-LLO

Ausgehend vom Plasmid pET29b-LLO wurde die Gensequenz des LLO mittels Polymerase Kettenreaktion (Mullis *et al.*, 1986) amplifiziert (2.12.5). Es folgten die Ligation in den TOPO-Vektor (2.12.6), die Isolierung der p-TOPO-DNA und der Verdau mit den Restriktionsendonukleasen *BspEI* und *Sall* (2.12.4). Der Vektor pGEX-4T1-E<sub>8</sub>C-PE38 wurde mit den gleichen Enzymen verdaut. Nun erfolgte die Ligation des LLO-Fragmentes in den geschnittenen Vektor (2.12.7), wodurch der Expressionsvektor pGEX-4T1-E<sub>8</sub>C-LLO entstand. Bei diesem Vektor wird die Expression von LLO als N-terminalem Fusionspartner von Glutathion-S-Transferase (GST) unter der Kontrolle des *Tac*-Promoters realisiert. Ziel der Klonierung war jedoch die Expression von LLO als N-terminale polyionische Fusion mit 8 Glutamaten und 1 Cystein. Zwischen GST und dem Glutamat-tag befindet sich ein Glycin-Serin-linker (GS). Nach der Abspaltung von GST mit Thrombin verbleiben die zusätzlichen Aminosäuren GSPEF am Zielprotein E<sub>8</sub>C-LLO (Abbildung 2.1).



**Abbildung 2.1:** Schematische Darstellung des Proteins GST-E<sub>8</sub>C-LLO vor und nach dem Thrombin-Verdau. Die Aminosäuren GSPEF verbleiben vor der polyionischen E<sub>8</sub>C-Fusion am N-Terminus. Am C-Terminus befindet sich ein His<sub>6</sub>-tag.

### Konstruktion des Expressionsvektors pET22b-MICA-E<sub>8</sub>C

Als Ausgangskonstrukt diente der Vektor pET22b-MICA. Mit Hilfe einer PCR wurde die Gensequenz für MICA amplifiziert und mittels des 3'-Oligonukleotides um eine DNA-Sequenz erweitert, welche für die Aminosäuren GSCE<sub>8</sub>P codiert und eine *XhoI*-Schnittstelle besitzt. Nach der Klonierung der PCR-Fragmente in den TOPO-Vektor erfolgte die Isolierung der p-TOPO-DNA und der Restriktionsverdau mit den Enzymen *NdeI* und *XhoI*. Aus dem Vektor pET22b-MICA wurde mit den gleichen Enzymen das MICA-Fragment herausgeschnitten. Durch die Ligation des geschnittenen Vektors und der verdauten MICA-E<sub>8</sub>C-PCR-Fragmente entstand der Expressionsvektor pET22b-MICA-E<sub>8</sub>C. Dieser Vektor ermöglicht die Expression von MICA mit C-terminaler polyionischer E<sub>8</sub>C-Fusion.

## 2.12.10 Stammhaltung und Kultivierung von Mikroorganismen

### 2.12.10.1 Stammhaltung und Anzucht von Mikroorganismen

Für einen Zeitraum von bis zu 4 Wochen erfolgte die Stammhaltung von Mikroorganismen auf LB-Agar-Platten bei 4 °C. Für die langfristige Lagerung von Mikroorganismen wurden Glycerinkulturen angelegt. Dazu wurden 800 µL einer Übernachtskultur mit 200 µL sterilem 20 mM Tris, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 40 % (v/v) Glycerin, pH 8.0 gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Die Anzucht von Mikroorganismen erfolgte sowohl in Reagenzgläsern mit 5 mL LB-Medium als auch in 100 mL Schüttelkolben mit 25 mL LB-Medium über Nacht bei 37 °C in einem Schüttelinkubator bei 130 rpm. Je nach verwendetem *E. coli*-Stamm und Plasmid wurde den LB-Medien das entsprechende Antibiotikum zugesetzt. Das Animpfen der Flüssigkulturen erfolgte entweder mit einer Einzelkolonie von einer LB-Agar-Platte oder aus einer Glycerinkultur.

### 2.12.10.2 Herstellung elektrokompetenter Zellen zur Elektroporation

Für die Herstellung elektrokompetenter Bakterienzellen wurden 200 mL LB-Medium 1:100 mit einer Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer optischen Dichte von 600 (OD<sub>600</sub>) von 0.5 vermehrt. Im Anschluss wurde die Kultur für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen zentrifugiert (15 min, 5000 rpm, 4 °C, JA-20), das Zellpellet in 200 mL sterilem Wasser mit 10 % (v/v) Glycerin resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt, wobei das Volumen zur Resuspension der Zellen sukzessiv auf 750 µL verringert wurde. Nach der letzten Zentrifugation wurden die Zellen in 500 µL sterilem 10 % (v/v) Glycerin resuspendiert, zu 50 µL aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### 2.12.10.3 Herstellung chemokompetenter Zellen

Für die Herstellung chemokompetenter Zellen wurden 50 mL LB-Medium 1:50 mit einer Vorkultur angeimpft und die Zellen bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.3 – 0.4 vermehrt. Nach dem Abkühlen der Kultur für 30 min auf Eis wurden die Zellen zentrifugiert (15 min, 5000 rpm, 4 °C, JA-20) und in 25 mL eiskaltem 0.1 M CaCl<sub>2</sub> resuspendiert. Die Zellsuspension wurde für 20 min auf Eis inkubiert, zentrifugiert und anschließend in 3 mL 0.1 M CaCl<sub>2</sub> mit 25 % (v/v) Glycerin resuspendiert. Die Zellen wurden aliquotiert, für 3 – 4 h auf Eis inkubiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

### 2.12.10.4 Transformation von Mikroorganismen

#### Transformation elektrokompetenter *E. coli*

Für die Transformation von *E. coli* mittels Elektroporation wurden 50 µL elektrokompetente Zellen auf Eis aufgetaut, mit 1 µL Plasmid-DNA (100 ng/µL) gemischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette pipettiert. Mit einer Spannung von 1.8 kV, einem Widerstand von 200 Ω und einer Kapazität von 25 µF wurde die Elektroporation am Gene Pulser II (Biorad, München) durchgeführt. Nach dem Spannungspuls wurden die *E. coli* sofort in 500 µL 37 °C warmes SOC-Medium überführt

und 45 min bei 37 °C und 600 rpm im Thermomixer *compact* inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension auf LB-Agar-Platten mit dem jeweiligen Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Transformation chemokompetenter *E. coli*

Für die Transformation chemokompetenter *E. coli* wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, mit 2 µL Plasmid versetzt und 20 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation von 1.5 min bei 42 °C, der sofort eine Inkubation der Zellen für 2 min auf Eis folgte. Danach wurden die *E. coli* in 37 °C warmes SOC-Medium überführt und 1 h bei 37 °C und 600 rpm im Thermomixer *compact* inkubiert. Anschließend erfolgte das Ausplattieren der Zellsuspension auf LB-Agar-Platten mit dem jeweiligen Antibiotikum und die Inkubation über Nacht bei 37 °C.

**2.12.10.5 Expression im Schüttelkolben**

Die Proteinexpression im analytischen Maßstab wurde in 100 mL Schüttelkolben mit 25 mL LB-Medium und den entsprechenden Antibiotika durchgeführt. Für die Expression wurde das Medium mit einer Übernachtskultur 1:50 angeimpft und bei 37 °C und 130 rpm geschüttelt. Stündlich wurde die optische Dichte (OD<sub>600</sub>) der Kultur bestimmt. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte bei einer OD<sub>600</sub> von 0.8 durch Zugabe von 1 mM IPTG. Vor Induktion, bzw. nach 1 h, 2 h, 3 h und 4 h wurden Proben aus der Kultur entnommen und mit dem BugBuster<sup>®</sup> *Protein Extraction Reagent* nach den Angaben des Herstellers aufgearbeitet, um zwischen löslicher und unlöslicher Expression unterscheiden zu können. Die Proteinexpression wurde anschließend mittels SDS-PAGE analysiert.

Tabelle 2.17: Übersicht zu den Expressionsbedingungen der verwendeten Proteine

Protein	Bakterienstamm	Antibiotika	Expressionszeit	Expressions-temperatur
GST-E <sub>8</sub> C-LLO	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Ampicillin	4 h	24 °C
B3-V <sub>H</sub> -R <sub>8</sub> CP	<i>E. coli</i> BL21-CodonPlus <sup>®</sup> (DE3)-RIL	Ampicillin, Chloramphenicol	4 h	35 °C
B3-V <sub>L</sub>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Ampicillin	4 h	37 °C
MICA	<i>E. coli</i> BL21-CodonPlus <sup>®</sup> (DE3)-RIL	Ampicillin, Chloramphenicol	4 h	37 °C
MICA-E <sub>8</sub> C	<i>E. coli</i> BL21-CodonPlus <sup>®</sup> (DE3)-RIL	Ampicillin, Chloramphenicol	3 h	37 °C
NKG2D	<i>E. coli</i> BL21-CodonPlus <sup>®</sup> (DE3)-RIL	Ampicillin, Chloramphenicol	4 h	37 °C

Die präparative Proteinexpression erfolgte analog dazu in 5 L Schüttelkolben mit je 1 L LB-Medium. Nach der Expression folgte die Zellernte durch Zentrifugation für 20 min bei 5000 rpm und 4 °C mit dem Rotor JLA-8.1000. Die Biofeuchtmasse wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Die Tabelle 2.17 gibt einen Überblick über die Expressionsbedingungen der verschiedenen Proteine.

### 2.12.10.6 Expression durch Kultivierung im Bioreaktor

Die Expression der schweren Kette des Antikörperfragmentes B3-R<sub>8</sub>CP in *E. coli* BL21-CodonPlus® (DE3)-RIL erfolgte in einem Biostat ED-Bioreaktor mit digitalem Mess- und Regelsystem (DCU) und dem Prozessleitsystem MCFSwin. Die Kultivierung erfolgte dabei nach dem *Fed-Batch*-Verfahren auf Hefeextrakt-Vollmedium (siehe 2.9). Das Medium wurde mit 200 mL einer zentrifugierten und in frischem LB-Medium resuspendierten Übernachtskultur angeimpft und bei einer Temperatur von 35 °C kultiviert. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von 10 %iger Natronlauge bzw. Phosphorsäure auf 7.0 reguliert. Der pO<sub>2</sub>-Wert wurde während der gesamten Fermentation manuell durch Variation der Rührgeschwindigkeit bzw. Luft- und Sauerstoffzufuhr auf mindestens 30 % Sättigung eingestellt. Nach dem Verbrauch der Glukose im Medium (Überprüfung mittels Glukosesensorstäbchen) wurde kontinuierlich etwa 1 L *Feeding*-Lösung pro Stunde in den Bioreaktor geleitet. Nach 4 h Kultivierungszeit wurde dem Medium erneut 100 µg/mL Ampicillin zugesetzt. Bei einer OD<sub>600</sub> von 40 erfolgte die Induktion der Proteinexpression mit 1 mM IPTG. Die *E. coli* wurden 4 h nach der Induktion durch Zentrifugation (6000 rpm, 20 min, 4 °C, Rotor JLA-8.1000) geerntet und bis zur Aufarbeitung wurde die Biomasse bei –80 °C gelagert. Die Expression der leichten Kette des Antikörperfragmentes B-R<sub>8</sub>CP3 in *E. coli* BL21 (DE3) erfolgte analog dazu bei 37 °C. Die Induktion erfolgte bei einer OD<sub>600</sub> von 56 für 4 h. Nach der Zellernte wurden die Zellen ebenfalls bei –80 °C gelagert bis zur weiteren Verwendung.

## 2.13 Proteinchemische und analytische Methoden

### 2.13.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Durch die SDS-PAGE können Proteine in denaturierter Form aufgrund ihrer molekularen Masse in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden (Laemmli, 1970). Die Proteine bilden mit dem im Gel und Probenpuffer vorhandenen SDS Komplexe, erhalten somit eine negative Nettoladung und können anhand ihrer molekularen Masse elektrophoretisch getrennt werden. In dieser Arbeit wurden 6 %ige Sammelgele und Trenngele von 10 %, 12 %, 15 % und 18 % verwendet. Die Zusammensetzung der SDS-Gele ist Tabelle 2.10 zu entnehmen. Die Proteinproben wurden mit ¼ Volumen SDS-Probenauftragspuffer (Tabelle 2.9) versetzt und für 5 min bei 95 °C inkubiert. Proben, die unter nicht reduzierenden Bedingungen untersucht werden sollten, wurden für 20 min bei 40 °C inkubiert. Nach dem Auftragen auf das Gel erfolgte die Elektrophorese bei einer Stromstärke von 35 mA für 45 – 60 min. Im Anschluss wurden die Gele entweder nach der Methode von Fairbanks (Fairbanks *et al.*, 1971) gefärbt (Tabelle 2.9) oder mittels Silberfärbung nach Nesterenko (Nesterenko *et al.* 1994). Die Silberfärbung ist sehr sensitiv und erlaubt die Detektion geringer Proteinmengen bis zu 1 ng. Gele, welche nach der Elektrophorese für einen Western Blot (2.13.2) eingesetzt wurden, wurden nicht gefärbt.

### 2.13.2 Western Blot

Im Anschluss an eine gelelektrophoretische Trennung von Proteinen wurden diese mittels einer Semidry Blotapparatur (GE Healthcare, Freiburg) auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Der Transfer erfolgte mit Blotting Puffer nach der Methode von Kyhse-Andersen (1984) für mindestens 1 h bei einer konstanten Stromstärke von 100 mA. Hierfür wurde das Gel auf die in Blotting Puffer inkubierte Membran gelegt und zwischen je drei Lagen in Blotting Puffer getränkten Blotting Papiers platziert. Nach dem Transfer erfolgte eine Absättigung der freien Proteinbindungsstellen durch die Inkubation der Membran in 5 %iger Magermilchlösung (in TBT-Puffer) über Nacht bei 4 °C. Danach folgte die Zugabe des primären Antikörpers in TBT-Puffer mit 5 % Magermilch (w/v) für 1 h – 4 h bei Raumtemperatur. Nach dem dreimaligen Waschen der Membran in TBT-Puffer für je 10 min erfolgte die Inkubation mit dem entsprechenden sekundären Antikörper (1:2000 verdünnt in 5 % Magermilch (w/v) in TBT-Puffer). Anschließend wurde die Membran dreimal 20 min mit TBT gewaschen und danach kurz mit bidestilliertem H<sub>2</sub>O gespült. Durch Inkubation der Membran mit dem ECL Plus-Detektionsreagenz (Tabelle 2.4) nach den Angaben des Herstellers wurde durch die an den sekundären Antikörper gekoppelte Peroxidase Chemolumineszenz ausgelöst. Mit einem für 20 s – 15 min aufgelegten Autoradiographiefilm und der anschließenden Entwicklung des Filmes erfolgte der Nachweis der Proteine.

Für *dot blots* wurden die Proteine direkt auf die Nitrozellulose-Membran pipettiert und diese für mindestens 2 h bei Raumtemperatur getrocknet. Die weitere Behandlung erfolgte analog zu Western Blots, beginnend mit der Absättigung freier Proteinbindungsstellen. Die hier verwendeten Puffer und Lösungen finden sich in Tabelle 2.9.

### 2.13.3 Proteinisierung und -reinigung

#### 2.13.3.1 Herstellung des Rohextraktes von löslichem GST-E<sub>8</sub>C-LLO

Zur Isolierung des löslich exprimierten Proteins GST-E<sub>8</sub>C-LLO wurden 25 g Biofeuchtmasse (*E. coli* BL21 (DE3) pGEX-4T1-E<sub>8</sub>C-LLO) in 50 mL Aufschlusspuffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, 5 mM DTT, pH 7.3) unter Zusatz einer Tablette Protease-Inhibitor (Roche Diagnostics) mit Hilfe des Ultra-Turrax T25 resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch Hochdruckdispersion mittels Gaulin Micron Lab 40 mit 5 Passagen bei einem Druck von 600 bar. Anschließend wurden der Suspension 2 mM MgCl<sub>2</sub> (sterilfiltriert) zugegeben und der pH-Wert mit 1 M NaOH auf 8.0 eingestellt. Es folgte der Verdau der DNA durch Zugabe von 30 µL Benzonase für 30 min bei Raumtemperatur. Durch Zentrifugation (25000 rpm, 30 min, 4 °C, Rotor JA 30.50 Ti) wurden die unlöslichen Zellbestandteile abgetrennt. Der Überstand (Rohextrakt) wurde auf eine Glutathion-Sepharose-Säule aufgetragen (2.13.3.8).

#### 2.13.3.2 Isolierung von *inclusion bodies*

Die Isolierung von *inclusion bodies* erfolgte nach Rudolph *et al.* (1997). Als *inclusion bodies* wurden die schwere und die leichte Kette des Antikörperfragmentes B3, MICA, MICA-E<sub>8</sub>C und die extrazelluläre Domäne des Rezeptors NKG2D exprimiert. Für die Isolierung der *inclusion bodies* von

V<sub>H</sub>-R<sub>8</sub>CP und V<sub>L</sub> wurden 120 g Biofeuchtmasse (*E. coli* BL21-CodonPlus<sup>®</sup> (DE3)-RIL pB3-V<sub>H</sub>-R<sub>8</sub>CP bzw. *E. coli* BL21 (DE3) pB3-V<sub>L</sub>) in 600 mL Aufschlusspuffer (100 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8) mit Hilfe des Ultra-Turrax T25 resuspendiert. Nach dem Zusatz von 3 mg Lysozym pro Gramm Zellen und einer Inkubation von 1 h bei 4 °C erfolgte der Zellaufschluss mittels Gaulin Lab 60 mit 5 Passagen und einem Druck von 600 bar. Anschließend erfolgte die Zugabe von 3 mM MgCl<sub>2</sub> und das Einstellen des pH-Wertes auf 8.0 mit 1 M NaOH. Durch den Zusatz von 50 µL Benzonase für 1 h bei Raumtemperatur wurden die Nukleinsäuren verdaut. Im nun folgenden Schritt wurde die Suspension mit ½ Volumen 1.5 M NaCl, 60 mM EDTA, 6 % (v/v) Triton X-100, pH 7.0 gemischt und für 1 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend erfolgte mittels Zentrifugation (16000 rpm, 30 min, 4 °C, Rotor JLA-16.250) die Trennung der löslichen Fraktion (Überstand) von den sedimentierten *inclusion bodies* (unlösliche Fraktion). Das Pellet wurde nun zweimal mit 670 mM Tris, 33 mM EDTA, 500 mM NaCl, 2 % (v/v) Triton X-100, pH 7.0 gewaschen. Hierzu wurden die *inclusion bodies* in dem beschriebenen Puffer mit Hilfe des Ultra-Turrax T25 resuspendiert und anschließend zentrifugiert wie oben beschrieben. Es folgten nun sechs weitere Waschschriffe mit 100 mM Tris, 20 mM EDTA, pH 7.0, die ebenso durchgeführt wurden (resuspendieren und zentrifugieren). Die *inclusion bodies* wurden entweder bis zur weiteren Verwendung bei –20 °C gelagert oder sofort solubilisiert (2.13.3.3).

Für die Isolierung von *inclusion bodies* von MICA (*E. coli* BL21-CodonPlus<sup>®</sup> (DE3)-RIL pET22b-MICA), MICA-E<sub>8</sub>C (*E. coli* BL21-CodonPlus<sup>®</sup> (DE3)-RIL pET22b-MICA-E<sub>8</sub>C) und NKG2D (*E. coli* BL21-CodonPlus<sup>®</sup> (DE3)-RIL pET22b-NKG2D) wurden analog 30 g Biofeuchtmasse in 60 mL Aufschlusspuffer resuspendiert mit dem Ultra-Turrax T25. Die Zellen wurden nach der Lysozym-Inkubation mittels Gaulin Micron Lab 40 mit 4 Passagen bei einem Druck von 900 bar aufgeschlossen. Alle weiteren Schritte erfolgten wie oben beschrieben, jedoch wurde die Zellsuspension mit 20 µL statt 50 µL Benzonase inkubiert. Nach dem letzten Waschschriff wurden die *inclusion bodies* entweder bei –20 °C gelagert oder sofort solubilisiert (2.13.3.3).

### 2.13.3.3 Solubilisierung von *inclusion bodies*

Diese Methode erfolgte nach Rudolph *et al.* (1997). Es wurden je 6 g *inclusion bodies* von V<sub>H</sub>-R<sub>8</sub>CP und V<sub>L</sub> in 60 mL 6 M Guanidiniumhydrochlorid, 100 mM Tris, 1 mM EDTA, 100 mM DTT, pH 8.0 mit dem Ultra-Turrax T25 resuspendiert und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte das Absenken des pH-Wertes auf 2.5 durch tropfenweise Zugabe von 1 M HCl. Durch Zentrifugation (25000 rpm, 1 h, 20 °C, Rotor JA 30.50 Ti) wurden alle unlöslichen Bestandteile von den solubilierten *inclusion bodies* abgetrennt. Im Anschluss wurden die gelösten *inclusion bodies* für 3 h bei Raumtemperatur gegen 1 L 4 M Guanidiniumhydrochlorid, pH 2.0 dialysiert. Es folgte ein zweiter Dialyseschriff gegen 2 L 4 M Guanidiniumhydrochlorid, pH 3.0 über Nacht bei 4 °C. Nach der Dialyse wurden die gelösten *inclusion bodies* bei 25000 rpm für 1 h bei 4 °C zentrifugiert, um präzipitierte Proteine abzutrennen. Im Anschluss wurde die Proteinkonzentration nach der Methode von Bradford bestimmt (2.13.4).

Die *inclusion bodies* von MICA, MICA-E<sub>8</sub>C und NKG2D wurden nach Rudolph *et al.* (1997) und einem modifizierten Protokoll von Steinle *et al.* (2001) solubilisiert. Dazu wurden 1 – 2 g der *inclusion bodies* in 5 – 10 mL 6 M Guanidiniumhydrochlorid, 100 mM Tris, 50 mM Glycin, 1 mM EDTA, pH 8.0 mit dem Ultra-Turrax T25 resuspendiert. Danach wurden unter starkem Rühren 50 mL des genannten Puffers mittels der Pumpe P1 über Nacht zu den *inclusion bodies* getropft. Es folgte die

Zugabe von 100 mM DTT für 2 h bei 4 °C. Im Anschluss wurde der pH-Wert mit 1 M HCl auf 2.5 abgesenkt und die solubilisierten *inclusion bodies* von MICA, MICA-E<sub>8</sub>C und NKG2D wurden analog zu den *inclusion bodies* von V<sub>H</sub>-R<sub>8</sub>CP und V<sub>L</sub> weiterbehandelt. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde die Proteinkonzentration mittels UV/VIS-Spektroskopie bestimmt (2.14.1).

### 2.13.3.4 Renaturierung des B3-Antikörperfragmentes

Für die Renaturierung des disulfidverbrückten Fv-Fragmentes des monoklonalen Antikörpers B3 (nach Stubenrauch *et al.*, 2001) wurden die schwere und die leichte Kette der variablen Domäne eingesetzt. Hierzu wurden dem Renaturierungsansatz (5 L 100 mM Tris, 500 mM L-Arginin, 1 mM EDTA, 1 mM GSH, 1 mM GSSG, pH 8.5) die beiden Domänen V<sub>H</sub>-R<sub>8</sub>CP und V<sub>L</sub> in einem molaren Verhältnis von 5:1 langsam unter schnellem Rühren zugetropft. Vor Zugabe des Redoxsystems GSH/GSSG und der solubilisierten *inclusion bodies* wurde der Renaturierungspuffer filtriert, entgast und auf 15 °C temperiert. Die Proteinkonzentration an V<sub>H</sub>-R<sub>8</sub>CP und V<sub>L</sub> betrug maximal 30 µg/mL im Ansatz. Die Renaturierung erfolgte über 5 Tage bei 15 °C. In einem abschließenden Oxidationsschritt wurden dem Ansatz 15 mM GSSG zugesetzt. Nach Abschluss der Renaturierung wurde der Ansatz zentrifugiert (16000 rpm, 1 h, 4 °C), um präzipitierte Proteine abzutrennen. Diese wurden bis zur Verwendung für die zweite Renaturierung bei -20 °C gelagert. Der Überstand der Zentrifugation wurde mittels Ultrafiltration (2.13.5) auf ein Volumen von 100 mL eingeengt und anschließend dreimal gegen je 2 L 50 mM Tris, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4 dialysiert. Nach der Dialyse folgte eine Zentrifugation (25000 rpm, 1 h, 4 °C) zur Abtrennung der präzipitierten Proteine. Der Überstand der Zentrifugation wurde anschließend auf eine HiTrap<sup>TM</sup> SP HP-Säule (5 mL CV) geladen (2.13.3.9).

Die Präzipitate der ersten Renaturierung wurden in 50 mL 6 M Guanidiniumhydrochlorid, 100 mM Tris, 1 mM EDTA, 50 mM DTT, pH 8.0 gelöst und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde diese Lösung langsam unter schnellem Rühren dem filtrierten, entgasten und temperierten Renaturierungspuffer (5 L 100 mM Tris, 500 mM L-Arginin, 1 mM EDTA, 1 mM GSH, 1 mM GSSG, pH 8.5) zugetropft. Die zweite Renaturierung erfolgte wie oben beschrieben über 5 Tage und endete mit der Zugabe von 5 mM GSSG, anschließender Zentrifugation, Aufkonzentrierung und Dialyse.

### 2.13.3.5 Renaturierung von MICA und MICA-E<sub>8</sub>C

Für die Renaturierung von MICA und MICA-E<sub>8</sub>C wurden die solubilisierten *inclusion bodies* der beiden Proteine eingesetzt. MICA wurde nach Steinle *et al.* (2001) renaturiert. Um die Ausbeute an renaturiertem Protein zu erhöhen, wurde in anschließenden Renaturierungen von MICA und MICA-E<sub>8</sub>C jedoch die nachfolgend beschriebene Methode (modifiziert nach Stubenrauch *et al.*, 2001) verwendet. Das auf unterschiedliche Weise renaturierte MICA wurde im Anschluss mittels *reversed phase* Chromatographie analysiert. Für die Renaturierung von MICA und MICA-E<sub>8</sub>C (modifiziert nach Stubenrauch *et al.*, 2001) wurden die solubilisierten *inclusion bodies* über die Pumpe P1 sehr langsam in den schnell rührenden, filtrierten und entgasten Renaturierungspuffer (4 L 100 mM Tris, 600 mM L-Arginin, 1 mM EDTA, 1 mM GSH, 1 mM GSSG, pH 8.4) getropft. Dabei wurden, über eine Zeitschaltuhr gesteuert, alle 5 h für 15 min solubilierte *inclusion bodies* bis zu einer

Endkonzentration von 50 µg/mL im Ansatz zugesetzt. Die Renaturierung erfolgte über 4 Tage bei 8 °C. Im Anschluss wurde der Ansatz zentrifugiert (16000 rpm, 30 min, 4 °C) und der Überstand mittels Ultrafiltration (2.13.5) auf ein Volumen von 70 mL aufkonzentriert. Das Proteinkonzentrat von MICA wurde dreimal gegen je 1.5 L 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, pH 8.0 dialysiert und anschließend bei 25000 rpm für 1 h bei 4 °C zentrifugiert, um präzipitierte Proteine abzutrennen. Der Überstand der Zentrifugation wurde auf eine Ni-NTA HisTrap™ HP-Säule (5 mL CV) geladen (2.13.3.10). Das Proteinkonzentrat von MICA-E<sub>8</sub>C wurde dreimal gegen je 1.5 L 50 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4 dialysiert und anschließend bei 22500 rpm für 1 h bei 4 °C zentrifugiert, um präzipitierte Proteine abzutrennen. Der Überstand der Zentrifugation wurde 1:2 mit 50 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.4 verdünnt und auf eine HiTrap™ Q HP-Säule (5 mL CV) geladen (2.13.3.11).

### 2.13.3.6 Renaturierung von NKG2D

Für die Renaturierung der extrazellulären Domäne des Rezeptors NKG2D wurden die solubilisierten *inclusion bodies* des Proteins eingesetzt. Die Renaturierung erfolgte modifiziert nach Steinle *et al.* (2001). Dazu wurden 70 mL Proteinlösung mit einer Konzentration von 0.7 mg/mL nach dem nachfolgend aufgeführten Schema (Tabelle 2.18) dialysiert.

Tabelle 2.18: Schritte zur Renaturierung von NKG2D

Schritt	Konzentration GdmHCl <sup>1)</sup>	Puffer	Konzentration PMSF <sup>2)</sup>	Konzentration GSH	Konzentration GSSG
1	4 M	BRB	0.2 mM	2 mM	0.2 mM
2	2 M	BRB	0.2 mM	1 mM	0.1 mM
3	1 M	BRB	0.2 mM	0.5 mM	0.05 mM
4	-	BRB	0.2 mM	0.5 mM	0.05 mM
5	-	¼ BRB	0.2 mM	-	-
6	-	50 mM Tris, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4	-	-	-

<sup>1)</sup> GdmHCl = Guanidiniumhydrochlorid, <sup>2)</sup> PMSF = Phenylmethylsulfonylfluorid, <sup>3)</sup> BRB = Basis-Renaturierungspuffer (100 mM Tris, 400 mM L-Arginin, 1 mM EDTA, pH 8.0)

Nach dem letzten Dialyseschritt wurde die Proteinlösung zentrifugiert (25000 rpm, 1 h, 4 °C) und der Überstand der Zentrifugation über Amicon-Zentrifugalkonzentratoren aufkonzentriert (2.13.5). Das Proteinkonzentrat wurde anschließend über Gelfiltration gereinigt (2.13.3.12).

### 2.13.3.7 Chromatographische Methoden

Bis auf die chromatographische Analytik von Proteinen mittels *reversed phase* Chromatographie erfolgten sämtliche Reinigungsschritte von Proteinen und Proteinkonstrukten bei 4 °C. Sämtliche

Puffer wurden filtriert und entgast für die Chromatographie eingesetzt. Von allen Proteinen wurde nach dem letzten Reinigungsschritt die Proteinkonzentration mittels UV/VIS-Spektroskopie bestimmt (2.14.1). Danach wurde das Protein aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei  $-80\text{ °C}$  gelagert.

### **Affinitätschromatographie**

Die Affinitätschromatographie nutzt die spezifische, hochaffine aber reversible Interaktion von Proteinen mit immobilisierten Liganden zur Trennung von Proteingemischen. Bei den an eine Trägermatrix immobilisierten Liganden handelt es sich um Cofaktoren, Inhibitoren, Substrate oder Substratanaloga. Die Elution des Zielproteins wird durch Aufhebung der Wechselwirkung mit dem Ligand erreicht.

Im Falle der immobilisierten Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC) ermöglicht die Fusion eines *Histidin-tags* an ein Protein dessen Reinigung an einer Nickel-NTA-Matrix. Die Wechselwirkung beruht auf der Chelatierung von an der Matrix immobilisierten Ni-Ionen durch die Imidazolgruppen der Histidine. Durch Zugabe von Imidazol zum Elutionspuffer wird die Wechselwirkung kompetitiert und das Zielprotein somit von der Matrix eluiert.

Bei der Glutathion-Affinitätschromatographie wurde die Affinität der *Glutathion-S-Transferase* zu ihrem Substrat, dem GSH, zur Reinigung von GST-Fusionsproteinen genutzt. Durch Verwendung einer Säule, an deren Matrix GSH immobilisiert ist, kann das Fusionsprotein spezifisch aus dem Rohextrakt gebunden werden. Die Elution des Proteins erfolgt durch in Puffer gelöstes GSH.

### **Ionenaustauschchromatographie**

Bei der Ionenaustauschchromatographie werden Proteine aufgrund ihrer unterschiedlichen Ladungen separiert. Durch elektrostatische Wechselwirkung der Proteine mit der entgegengesetzt geladenen Säulenmatrix wird eine Trennung erreicht. Die Bindung der Proteine an die Matrix ist von mehreren Faktoren abhängig; dem pH-Wert und der Ionenstärke des Puffers, dem isoelektrischen Punkt der Proteine und der Verteilung der Ladungen auf der Proteinoberfläche bzw. Matrix. Die Elution der Proteine von der Säulenmatrix kann entweder durch die Erhöhung der Ionenstärke im Elutionspuffer oder eine Änderung des pH-Wertes erreicht werden.

### **Größenausschlusschromatographie (Gelfiltration)**

Die Gelfiltration beruht auf dem Prinzip der Trennung von Proteinen nach ihrer Größe bzw. ihrem hydrodynamischen Radius. Die Gelmatrix ist dabei von hydrophilen Poren definierter Größe durchsetzt. Große Moleküle können eine solche Säule schneller durchwandern, da sie schlechter in die Poren der Gelmatrix einzudringen vermögen als kleinere Moleküle, welche langsamer durch die Matrix gelangen. Je kleiner ein Molekül ist, desto größer ist sein Elutionsvolumen. Niedermolekulare Substanzen wie DTT und GSH wurden mittels einer kleinen Gelfiltrationssäule (PD-10) von Proteinen abgetrennt. Neben präparativen Zwecken zur Proteinreinigung wurden auch analytische Gelfiltrationen durchgeführt.

### ***reversed phase* Chromatographie**

Das Trennprinzip der *reversed phase* Chromatographie beruht auf der hydrophoben Wechselwirkung des Proteins mit der stationären und mobilen Phase. Bei der stationären Phase handelt es sich um hydrophobe Liganden, welche kovalent an das Trägermaterial gekoppelt sind. Die mobile Phase ist ein Gemisch aus Wasser und einem organischen Lösungsmittel, meist Acetonitril. Das in einer wässrigen Lösung vorliegende Protein wird durch die Liganden der Matrix aufgrund der hydrophoben Wechselwirkungen gebunden. Zur Elution des Proteins von der Matrix wird kontinuierlich der Anteil des organischen Lösungsmittels in der mobilen Phase erhöht. Die *reversed phase* Chromatographie wurde sowohl zu analytischen Zwecken als auch zur Probenvorbereitung für die Massenspektrometrie genutzt und an einem Gynkotek HPLC-System (Dionex) durchgeführt.

### **2.13.3.8 Reinigung und proteolytische Spaltung von GST-E<sub>8</sub>C-LLO**

Die Reinigung des GST-E<sub>8</sub>C-LLO aus dem Rohextrakt (2.13.3.1) erfolgte im ersten Schritt über eine mit Aufschlusspuffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, 5 mM DTT, pH 7.3) äquilibrierte GSH-Sepharose-Säule. Der gesamte Rohextrakt wurde nach der Zentrifugation auf die Säule geladen. Die Säule wurde zuerst mit 10 Säulenvolumen Puffer B (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 0.1 % (v/v) Tween 20, 10 % (v/v) Glycerin, 5 mM DTT, pH 7.0 gewaschen und anschließend über 15 Säulenvolumen mit Puffer C (Puffer B ohne Tween 20 und Glycerin). Die Elution des GST-E<sub>8</sub>C-LLO erfolgte über 1 Säulenvolumen mit 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM GSH, pH 8.0. Die Fusionsprotein enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und dreimal gegen je 2 L Thrombin-Spaltungspuffer (20 mM Tris, 200 mM NaCl, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 80 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.5 mM KCl) dialysiert. Im Anschluss wurden der Proteinlösung 10 U/mL von in Spaltungspuffer gelöstem Thrombin zugesetzt und die Proteinlösung unter schwachem Rühren für 11 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Protein auf eine mit 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 700 mM NaCl, 10 mM 2-Mercaptoethanol, pH 7.3 äquilibrierte Ni-NTA HisTrap<sup>™</sup> HP (5 mL CV) geladen. GST-E<sub>8</sub>C-LLO und E<sub>8</sub>C-LLO wurden dabei an die Säule gebunden, wohingegen sich GST und Thrombin im Durchfluss befanden. Nach einem Waschschrift über 5 Säulenvolumen mit 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20 mM Imidazol, 10 mM 2-Mercaptoethanol, pH 7.3 erfolgte die Elution in einem linearen Gradienten von 20 mM – 600 mM Imidazol mit Elutionspuffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 600 mM Imidazol, 10 mM 2-Mercaptoethanol, pH 7.3). Das eluierte Protein wurde vor dem letzten Reinigungsschritt gegen zweimal 2 L 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, pH 7.3 dialysiert und anschließend nochmals auf eine mit Aufschlusspuffer äquilibrierte GSH-Sepharose-Säule geladen. Der Durchfluss enthielt das gespaltene E<sub>8</sub>C-LLO, wohingegen ungespaltenes GST-E<sub>8</sub>C-LLO an die Säule band. Abschließend wurde das Toxin E<sub>8</sub>C-LLO gegen Lagerungspuffer (25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, pH 7.3) dialysiert.

### **2.13.3.9 Reinigung des B3-Antikörperfragmentes**

Die Reinigung von B3-R<sub>8</sub>CP erfolgte im Anschluss an die Renaturierung (2.13.3.4) aufgrund des positiv geladenen Arginin-*tags* mittels Kationenaustauschchromatographie. Dazu wurde eine mit 50 mM Tris, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4 äquilibrierte HiTrap<sup>™</sup> SP HP-Säule (5 mL CV) mit

der dialysierten Proteinlösung beladen und die Säule mit 20 Säulenvolumen des genannten Puffers gewaschen. Anschließend erfolgte die Elution des Proteins in einem linearen Gradienten von 200 mM – 2 M NaCl über 40 Säulenvolumen. Nach der Überprüfung der Elutionsfraktionen mittels SDS-PAGE wurden die B3-R<sub>8</sub>CP-entaltenden Fraktionen vereinigt, mit 5 Volumen 50 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.4 verdünnt und erneut auf die Säule geladen. Die Elution erfolgte in einem Säulenvolumen. Anschließend erfolgte die Dialyse des B3-Antikörperfragmentes gegen zweimal 2 L 50 mM Tris, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4, an die sich eine Größenausschlusschromatographie in dem gleichen Puffer anschloss. Abschließend wurde das Protein mittels Amicon Zentrifugalkonzentratoren aufkonzentriert und die Proteinkonzentration bestimmt (2.14.1).

### 2.13.3.10 Reinigung von MICA

Für die Reinigung von MICA wurde die Proteinlösung nach der Dialyse und Zentrifugation (2.13.3.5) auf eine mit 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 5 mM Imidazol, pH 8.0 äquilibrierte Ni-NTA HisTrap™ HP-Säule (5 mL CV) geladen und die Säule mit 10 Säulenvolumen des Äquilibrierungspuffers gewaschen. Das Protein wurde in einem Säulenvolumen mit 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 500 mM Imidazol, pH 8.0 eluiert. Es folgte eine Dialyse gegen zweimal 1.5 L 50 mM Tris, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4, der sich eine Größenausschlusschromatographie in dem gleichen Puffer anschloss. Abschließend folgte die Konzentrierung des Proteins mittels Amicon Zentrifugalkonzentratoren und die Bestimmung der Proteinkonzentration (2.14.1).

### 2.13.3.11 Reinigung von MICA-E<sub>8</sub>C

Die Reinigung von MICA-E<sub>8</sub>C erfolgte im Anschluss an die Renaturierung (2.13.3.5) aufgrund des negativ geladenen Glutamat-*tags* mittels Anionenaustauschchromatographie. Dazu wurde die verdünnte Proteinlösung auf eine mit 50 mM Tris, 30 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4 äquilibrierte HiTrap™ Q HP-Säule (5 mL CV) geladen. Die Elution erfolgte in einem linearen Gradienten von 30 mM – 2 M NaCl über 30 Säulenvolumen. Die MICA-E<sub>8</sub>C-enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, mit 4 Volumen 50 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.4 verdünnt, erneut auf die Säule aufgetragen und in einem Säulenvolumen eluiert. Das Protein wurde anschließend dreimal gegen je 1.5 L 50 mM Tris, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4 dialysiert. Es schloss sich eine Größenausschlusschromatographie in dem gleichen Puffer an. Abschließend wurde das Protein mittels Amicon Zentrifugalkonzentratoren aufkonzentriert und die Proteinkonzentration bestimmt (2.14.1).

### 2.13.3.12 Reinigung von NKG2D

Das nach der Renaturierung erhaltene Proteinkonzentrat (2.13.3.6) wurde über Größenausschlusschromatographie in 50 mM Tris, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4 gereinigt. Die NKG2D-Monomer enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und mittels Amicon Zentrifugalkonzentratoren aufkonzentriert.

### 2.13.3.13 Kopplung und Reinigung von B3-LLO

Beide Proteine können aufgrund ihrer entgegengesetzt geladenen polyionischen Fusionen miteinander interagieren und durch Ausbildung einer Disulfidbrücke kovalent verknüpft werden. Für die Herstellung des bifunktionellen Konstruktes B3-LLO aus B3-R<sub>8</sub>CP und E<sub>8</sub>C-LLO wurden die beiden Proteine mit 2 mM GSH für 40 min bzw. 5 mM GSH für 1 h bei 20 °C vorreduziert. Das überschüssige GSH wurde mittels Gelfiltration (PD-10-Säule) abgetrennt. Die Kopplung erfolgte nach dem Prinzip der kupferkatalysierten Oxidation an Luftsauerstoff in 25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 100 mM NaCl, 1 µM CuCl<sub>2</sub>, pH 8.5 bei einer Proteinkonzentration von jeweils 3 µM. Der Kopplungsansatz wurde für 20 h bei 22 °C inkubiert. Um die Thiolgruppe des singulären Cysteins des E<sub>8</sub>C-LLO zu oxidieren, wurde dem Ansatz 1 mM GSSG zugesetzt und für 3 h bei 22 °C weiter inkubiert. Danach wurde der pH-Wert des Ansatzes mit 10 %iger Phosphorsäure auf 6.5 gesenkt und die Proteinlösung 1:20 mit 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA, pH 6.5 verdünnt. Die Reinigung des B3-LLO erfolgte über eine Kationenaustauschchromatographie-Säule (HiTrap™ SP HP (1 mL CV)), welche mit 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA, pH 6.5 äquilibriert wurde. Nach dem Beladen der Säule konnte das B3-LLO in einem linearen Gradienten von 0 mM– 200 mM NaCl über 80 Säulenvolumen eluiert werden. Anschließend wurden alle B3-LLO-enthaltenden Fraktionen vereinigt, mit 4 Volumen 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA, pH 6.5 verdünnt, erneut auf die Säule aufgetragen und in einem Säulenvolumen eluiert. Das Protein wurde abschließend dreimal gegen je 0.5 L 25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, pH 6.5 dialysiert.

### 2.13.3.14 Kopplung und Reinigung von B3-MICA

Wie bereits für B3-LLO erwähnt, können beide Proteine aufgrund ihrer polyionischen Fusionen miteinander gekoppelt werden. Für die Herstellung des Immunkonjugates B3-MICA wurden die Proteine B3-R<sub>8</sub>CP und MICA-E<sub>8</sub>C zweimal gegen je 1 L Kopplungspuffer (20 mM Tris, 2 mM EDTA, 50 mM NaCl, pH 8.0) dialysiert. Im Anschluss wurden die Proteine äquimolar mit einer Konzentration von 6 µM gemischt und mit einem Redox-*shuffling*-System, bestehend aus 20 µM GSH und 80 µM GSSG, für 4 h bei 22 °C inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz 1:20 mit 50 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0 verdünnt und auf eine mit diesem Puffer äquilibrierte Anionenaustauschchromatographie-Säule (HiTrap™ Q HP-Säule (1 mL CV)) geladen. Nach einem Waschschrift über 5 Säulenvolumen erfolgte die Elution des B3-MICA in einem linearen Gradienten von 0 mM – 200 mM NaCl über 40 Säulenvolumen. In einem zweiten Gradienten von 200 mM – 1000 mM NaCl wurde das restliche Protein eluiert. Sämtliche B3-MICA-enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, 1:10 mit 50 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0 verdünnt, erneut auf die Säule aufgetragen und in einem Säulenvolumen eluiert. Das Protein wurde abschließend dreimal gegen je 0.5 L 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 50 mM NaCl, pH 7.8 dialysiert.

## 2.13.4 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Konzentration von solubilisierten *inclusion bodies* von V<sub>H</sub>-R<sub>8</sub>CP und V<sub>L</sub> wurde nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt. Dazu wurde das kolorimetrische Nachweisverfahren der Firma BioRad nach deren Angaben verwendet. Als Referenzprotein diente Rinderserumalbumin, welches in 4 M

Guanidiniumhydrochlorid, pH 3.0 gelöst war, in Konzentrationen von 25 – 850  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Der prozentuale Anteil von  $V_{\text{H-R}_8\text{CP}}$  und  $V_{\text{L}}$  in den *inclusion bodies* wurde densitometrisch bestimmt. Demnach betrug der Anteil an  $V_{\text{H-R}_8\text{CP}}$  an den *inclusion bodies* 18 %, der Anteil an  $V_{\text{L}}$  55 %.

### 2.13.5 Konzentrierung von Proteinlösungen

Die Aufkonzentrierung von Proteinlösungen mit einem Volumen von mehr als 500 mL erfolgte mittels Ultrafiltration und einer VivaFlow 200 Membran nach den Angaben des Herstellers. Dabei kam eine Hydrosart-Membran mit einem MWCO von 10 kDa und einer effektiven Filterfläche von  $50\text{cm}^2$  zum Einsatz. Kleinere Volumina an Proteinlösung (bis 100 mL) wurden mit Amicon Ultra-15 Zentrifugalkonzentratoren mit einem MWCO von 5 bzw. 10 kDa konzentriert. Sehr kleine Volumina (bis zu 2 mL) wurden mit Vivaspin 500 Zentrifugalkonzentratoren mit einem MWCO von 5 kDa aufkonzentriert.

### 2.13.6 Modifikation von Proteinen mit GSSG

Die Proteine LLO und  $\text{E}_8\text{C-LLO}$  wurden für Hämolyse-Experimente und den Einsatz in der Zellkultur mit GSSG modifiziert. Dazu wurden die Proteine für 30 min bei  $22\text{ }^\circ\text{C}$  mit 5 mM DTT inkubiert. Anschließend wurde der Überschuss an DTT mittels Gelfiltration (PD-10-Säule) abgetrennt und der Proteinlösung 50 mM GSSG zugesetzt. Nach einer Inkubation für 4 h bei  $22\text{ }^\circ\text{C}$  wurde das überschüssige GSSG durch extensive Dialyse gegen 25 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 200 mM NaCl, pH 7.4 entfernt. Die quantitative Oxidation von LLO und  $\text{E}_8\text{C-LLO}$  wurde mittels Massenspektrometrie und über die Bestimmung freier SH-Gruppen (2.13.7) bestätigt.

### 2.13.7 Bestimmung freier SH-Gruppen

Die Quantifizierung freier SH-Gruppen in Proteinen erfolgte nach Ellman (1959). Dabei reagiert das Reagenz 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) bei pH-Werten über 8.0 quantitativ mit im Protein zugänglichen SH-Gruppen. Durch die Reaktion wird ein Thionitrobenzoat-Anion freigesetzt, welches durch Absorption bei einer Wellenlänge von 410 nm detektiert werden kann. Zur Berechnung der Anzahl der freien SH-Gruppen wurde der molare Extinktionskoeffizient ( $\epsilon_{410}$  bei pH 8.0) von  $13600\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  verwendet.

### 2.13.8 Analytische Ultrazentrifugation

Sedimentations-Geschwindigkeitsläufe und Gleichgewichtsläufe zur Bestimmung der molekularen Masse und zur Untersuchung der Komplexbildung von MICA- $\text{E}_8\text{C}$  und NKG2D bzw. B3-MICA und NKG2D wurden an einer analytischen Ultrazentrifuge Optima XL-A in einem 8-Loch-Rotor bei einer Temperatur von  $20\text{ }^\circ\text{C}$  durchgeführt. Es wurden Doppelsektorzellen verwendet mit einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 40000 rpm für die Sedimentation und 12000 rpm (MICA- $\text{E}_8\text{C}$ /NKG2D) bzw. 10000 rpm (B3-MICA/NKG2D) für die Gleichgewichtsläufe. Die Messung wurde bei 230 nm bzw. 280 nm verfolgt. Für die Analyse der Komplexbildung von MICA- $\text{E}_8\text{C}$  und NKG2D wurden Protein-

konzentrationen von je 3.43  $\mu\text{M}$  in 25 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.4 verwendet. Für die Analyse von B3-MICA und NKG2D wurden Proteinkonzentrationen von je 0.83  $\mu\text{M}$  in 30 mM Tris, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.6 verwendet. Die analytische Ultrazentrifugation und die Auswertung der experimentellen Daten wurden freundlicherweise von PD Dr. Hauke Lilie (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) durchgeführt.

### 2.13.9 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie wurde als analytische Methode zur Bestimmung der molekularen Masse gereinigter bzw. mit GSSG modifizierter Proteine verwendet. Zur Probenvorbereitung wurden Proteine entweder mittels HPLC gereinigt und entsalzt oder durch ZipTips entsalzt (nach den Angaben des Herstellers). Die Messung erfolgte durch MALDI-TOF Massenspektrometrie an einem REFLEX-Spektrometer (Bruker-Franzen Analytik, Bremen) oder durch ESI-Massenspektrometrie an einem Esquire-LC-Ionenfallen-Massenspektrometer. Diese Arbeiten wurden freundlicherweise von Frau Dr. Angelika Schierhorn (Forschungsstelle „Enzymologie der Proteinfaltung“ der Max-Planck-Gesellschaft, Halle) durchgeführt.

### 2.13.10 Markierung von Proteinen mit Fluoreszenzfarbstoffen

Sowohl für fluoreszenzmikroskopische als auch durchflusszytometrische Analysen wurden Proteine mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert (Tabelle 2.19). Die reaktiven Gruppen des Farbstoffes erlauben entweder eine Kopplung an Aminogruppen (Succinimidyl-Ester) im Protein oder aber an freie SH-Gruppen (Maleimid-Farbstoffe) der Proteine. Der Farbstoff Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 5-TFP ist durch einen Tetrafluorphenylester (TFP) aktiviert, welcher mit Aminogruppen des Proteins zu einer stabilen Carboxylamidbindung reagiert. Die Markierung der Proteine mit den Fluoreszenzfarbstoffen erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Für die Kopplung von Farbstoff an freie SH-Gruppen wurden die Proteine mit GSH vorreduziert und dieses anschließend mittels Gelfiltration (PD-10-Säule) abgetrennt. Die Entfernung des ungebundenen Fluoreszenzfarbstoffes erfolgte durch extensive Dialyse bei 4 °C.

Tabelle 2.19: Zur Proteinmarkierung eingesetzte Fluoreszenzfarbstoffe

Protein	Markierung	Kopplung an:	Absorptions-/ Emissionsmaximum
B3-R <sub>8</sub> CP/B3-LLO/ E <sub>8</sub> C-LLOox <sup>1)</sup>	5-Carboxyfluorescein- Succinimidylester	Aminogruppen	495 nm/515 nm
MICA-E <sub>8</sub> C	Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 C5-Maleimid	Thiolgruppen	488 nm/519 nm
MICA-E <sub>8</sub> C/MICA	Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 5-TFP	Aminogruppen	488 nm/519 nm
B3-R <sub>8</sub> CP	Texas Red <sup>®</sup> C2-Maleimid	Thiolgruppen	595 nm/615 nm

<sup>1)</sup> E<sub>8</sub>C-LLOox = E<sub>8</sub>C-LLO, bei welchem die Thiolgruppen der Cysteine quantitativ mit GSSG oxidiert wurden

### 2.13.11 Stabilität von Proteinen gegenüber Proteasen im Serum

In dieser Arbeit wurden sowohl das Immuntoxin B3-LLO als auch das Immunkonjugat B3-MICA hinsichtlich ihrer Stabilität gegenüber in nicht hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FBS) befindlicher Proteasen analysiert. Dazu wurden 3 µg B3-LLO mit 10 % (v/v) PBS, 3 µg B3-LLO mit 10 % (v/v) FBS bzw. 10 % (v/v) FBS in Abwesenheit von B3-LLO jeweils 11 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben über eine 8 %ige SDS-PAGE aufgetrennt und nach der Färbung des SDS-Geles (Fairbanks *et al.*, 1971) analysiert. Die Analyse von B3-MICA erfolgte über eine Kinetik. Dazu wurden je 1 µg B3-MICA/Probe mit 10 % (v/v) FBS bei 37 °C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen, für 10 min mit 100 mM Jodacetamid inkubiert, mit nicht reduzierendem SDS-Probenpuffer versetzt und anschließend über eine 10 %ige SDS-PAGE aufgetrennt. Zur Analyse der Stabilität schloss sich an die Elektrophorese ein Western Blot an. Als Referenzen dienten B3-MICA bzw. FBS.

### 2.13.12 Bestimmung der hämolytischen Aktivität von LLO-Varianten und LLO-Konjugaten

Die Hämolyse ist ein Prozess, bei dem die Membran nativer Erythrozyten zerstört wird, was unter anderem die Freisetzung von Hämoglobin bewirkt. Dieser Vorgang kann durch die Zunahme an freiem Hämoglobin oder durch die Abnahme des Streulichtes einer Erythrozytensuspension aufgrund der Lyse der Erythrozyten verfolgt werden. Die Bestimmung des freigesetzten Hämoglobins erfordert zusätzliche Zentrifugationsschritte, wodurch Messartefakte auftreten können. Von Harris *et al.* (1991) wurde durch Messungen von Perfringolysin (PFO)-induzierter Hämolyse gezeigt, dass die Ergebnisse der Lichtstreuung sehr gut mit den Daten der Hämoglobin-Freisetzung übereinstimmen.

Zur Bestimmung der lytischen Aktivität von LLO-Varianten und LLO-Konjugaten wurde die Abnahme des Streulichtes einer Erythrozytensuspension in Abhängigkeit von der eingesetzten Proteinkonzentration gemessen. Die Erythrozytensuspension wurde durch Sedimentation des Hämatokrits aus Hammel-Vollblut erhalten. Dazu wurde 1 mL Hammelblut für 10 min bei 2000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert und die Erythrozyten anschließend dreimal mit dem jeweiligen Messpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Erythrozyten so in Messpuffer verdünnt, dass eine OD<sub>350</sub> von 1 erhalten wurde. Für Messungen unter physiologischen Bedingungen wurde PBS (Invitrogen) verwendet, für Messungen unter sauren Bedingungen Citratpuffer (20 mM Na-Citrat, 150 mM NaCl, pH 5.5). Für die Messung wurden 900 µL Erythrozytensuspension mit 100 µL Proteinlösung verschiedener Konzentrationen gemischt und 30 min bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Auswertung der Proben erfolgte durch Messung des Streulichtes bei einer Wellenlänge von 350 nm. Die Auswertung der Messung und die Ermittlung des EC<sub>50</sub>-Wertes erfolgten durch logarithmische Auftragung der Proteinkonzentration gegen den jeweiligen Absorptionswert bei einer Wellenlänge von 350 nm. Die Bestimmung des EC<sub>50</sub>-Wertes aus den Titrationskurven erfolgte anhand der nachfolgenden Gleichung (2) (Grauschopf, 2000).

$$(2) Y = Y_{\min} + \frac{Y_{\max}}{1 + 10^{(\log(c_{\text{PROTEIN}}) - \log(EC_{50}))}}$$

$y$  – Streulichtanteil der nicht-lysierten Erythrozyten

$y_{\max}$  – Streulichtanteil bei der niedrigsten Proteinkonzentration

$y_{\min}$  – Streulichtanteil bei der höchsten Proteinkonzentration

$c_{\text{PROTEIN}}$  – Konzentration an Protein

$EC_{50}$  – Proteinkonzentration, bei der 50 % der Erythrozyten lysiert wurden (halbmaximaler Streulichtwert)

## 2.14 Spektroskopische Methoden

### 2.14.1 UV/VIS-Spektroskopie

Die UV/VIS-Spektroskopie wurde in dieser Arbeit zur Bestimmung der Proteinkonzentration, für die Proteinbestimmung nach Bradford (2.13.4), die Bestimmung freier SH-Gruppen (2.13.7) und zur Streulichtmessung für die Bestimmung der hämolytischen Aktivität von LLO-Varianten (2.13.12) genutzt.

#### Bestimmung der Proteinkonzentration

Die aromatischen Aminosäuren Tryptophan (Trp) und Tyrosin (Tyr) zeigen in einem Wellenlängenbereich von 240 nm bis 340 nm charakteristische Spektren mit einem Maximum bei 280 nm (Trp) bzw. 274 nm (Tyr) (Galla, 1988). Die Absorption eines Proteins ist abhängig von seinem Gehalt an Trp, Tyr und Cystinen (Disulfidbrücken). Bei bekannter Aminosäuresequenz kann der molare Extinktionskoeffizient  $\epsilon_{280 \text{ nm}}$  näherungsweise wie folgt (3) berechnet werden nach Gill & von Hippel (1989):

$$(3) \quad \epsilon_{280 \text{ nm}} [\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}] = 5500 \times n_{\text{Trp}} + 1490 \times n_{\text{Tyr}} + 125 \times n_{\text{Disulfidbrücken}} \quad (n = \text{Anzahl})$$

Mit Hilfe der Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 280 nm kann somit die Konzentration des Proteins gemäß des Lambert-Beer'schen-Gesetzes (4) bestimmt werden.

$$(4) \quad I = I_0 \cdot 10^{-\epsilon \cdot c \cdot d} \quad \text{bzw. häufiger verwendet;} \quad A = \lg \frac{I_0}{I} = \epsilon \cdot c \cdot d$$

$I$  – Intensität des nicht absorbierten Lichtes

$I_0$  – Intensität des eingestrahnten Lichtes

$\epsilon$  – molarer Extinktionskoeffizient ( $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )

$c$  – molare Konzentration der Proteinlösung (M)

$d$  – Schichtdicke der Küvette (cm)

$A$  – gemessene Absorption (Extinktion)

Eine Auflistung der Extinktionskoeffizienten der in dieser Arbeit verwendeten Proteine findet sich in Tabelle 7.1 im Anhang.

### 2.14.2 Fluoreszenzspektroskopie

Unter Fluoreszenz versteht man einen Vorgang, bei dem ein durch Lichteinstrahlung angeregtes Molekül durch die Emission von Licht wieder in seinen energetisch günstigeren Grundzustand übergeht. In Proteinen sind, neben weiteren aromatischen Chromophoren, die aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin fluoreszenzspektroskopisch aktive Verbindungen. Das Spektrum der emittierten Strahlung ist stets bathochrom zum Absorptionsspektrum verschoben (Stokes-Regel).

#### Fluoreszenzspektren

Um die Bindung von MICA-E<sub>8</sub>C an die extrazelluläre Domäne des Rezeptors NKG2D zu analysieren, wurden von den einzelnen Proteinen (MICA-E<sub>8</sub>C und NKG2D) sowie einem äquimolaren Proteingemisch der beiden Proteine Fluoreszenzspektren aufgenommen. Durch die Bindung von MICA-E<sub>8</sub>C an NKG2D wird ein Teil der Fluoreszenz der an der Bindung beteiligten Tryptophane bzw. Tyrosine aufgehoben (*gequencht*). Somit ergibt sich für das gemessene Spektrum der beiden Proteine eine Differenz zu dem Spektrum, welches durch Addition der Einzelspektren erhalten wird. Die Messung erfolgte bei einer Proteinkonzentration von 1.71 µM in einer rühr- und verschließbaren Halbmikrofluoreszenzküvette QS mit einem Probenvolumen von 1200 µL an einem Fluoreszenzspektrometer (Fluoromax-3) mit Peltierelement bei 20 °C. Die Proteine waren in 25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 100 mM NaCl, pH 7.4 gelöst. Die Fluoreszenz wurde bei 295 nm angeregt und die Spektren von 300 – 400 nm aufgenommen.

#### Analyse thermisch induzierter Entfaltungsübergänge

Mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie können Veränderungen in den Tertiärstrukturen von Proteinen verfolgt werden. Dies beruht auf der Tatsache, dass sich bei einer thermisch induzierten Entfaltung des Proteins die Umgebung der aromatischen Aminosäuren und damit auch deren Fluoreszenz ändert. Die Analyse der thermischen Stabilität erfolgte vergleichend zwischen MICA und MICA-E<sub>8</sub>C. Die Messung erfolgte in einer rühr- und verschließbaren Mikrofluoreszenzküvette QS mit einem Probenvolumen von 1200 µL an einem Fluoreszenzspektrometer (Fluoromax-3) mit Peltier-Temperatursteuerung. Die Temperatur wurde in einem Bereich von 20 °C bis 80 °C schrittweise (Intervall 1 °C, Toleranz 0.25 °C, Äquilibrierungszeit 1 min) erhöht und die Intensitätsänderung der Proteinfluoreszenz (Anregung: 295 nm, Emission: 305 – 370 nm) aufgenommen. Die Proteinkonzentration betrug jeweils 50 µg/mL in 25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 100 mM NaCl, pH 7.4. Die Auswertung erfolgte bei einer Wellenlänge von 350 nm für MICA bzw. 352 nm für MICA-E<sub>8</sub>C.

### 2.14.3 CD-Spektroskopie

Linear polarisiertes Licht lässt sich in zwei Komponenten, links- und rechtszirkular polarisiertes Licht, zerlegen. Die CD-Spektroskopie beruht auf der Tatsache, dass chirale Moleküle links- und rechtszirkular polarisiertes Licht unterschiedlich stark absorbieren. Durch das periodische Messen dieses links- und rechtszirkular polarisierten Lichtes kann dessen Verhältnis bestimmt und der Absorptionsunterschied berechnet werden. Das erhaltene Signal gibt in Abhängigkeit von der Wellenlänge Auskunft über Sekundärstrukturelemente sowie Informationen über die Umgebung der aromatischen Aminosäuren und damit indirekt über die native Struktur der Proteine. Mit Hilfe der

Software CD Pro konnte anhand der Proteinspektren der Gehalt an Sekundärstrukturelementen bestimmt werden.

### Fern-UV-CD-Spektren zur Untersuchung des Sekundärstrukturgehaltes

Die Messung der CD-Spektren erfolgte an einem Jasco J-810 Spektropolarimeter mit Peltierelement in Quarzglasküvetten mit Schichtdicken von 0.1 mm, 0.5 mm, 1 mm und 1 cm. Die Spektren wurden in einem Wellenlängenbereich von 190 nm – 260 nm mit einer Messgeschwindigkeit von 50 nm/min in 0.2 nm-Schritten bei 20 °C aufgenommen. Es wurden jeweils 16 Spektren akkumuliert und anschließend pufferkorrigiert. Die Proteine waren in 25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 50 mM NaCl, pH 7.4 gelöst. Die gemessene Elliptizität  $\Theta$  wurde nach Gleichung (5) (Schmid, 1997) in die mittlere residuale Elliptizität  $[\Theta]_{MRW}$  umgerechnet. Die Berechnung der Additionsspektren von B3 und E<sub>8</sub>C-LLO bzw. B3 und MICA-E<sub>8</sub>C erfolgte nach den Gleichungen (6) und (7).

$$(5) [\Theta]_{MRW} = \frac{\Theta \cdot Mw}{10 \cdot c \cdot d \cdot n_{AS}}$$

$$(6) [\Theta]_{MRW} \text{ add} = ([\Theta]_{MRW} B3 \cdot (n_{AS} B3 / n_{AS} B3 - LLO) + [\Theta]_{MRW} E_8C - LLO \cdot (n_{AS} E_8C - LLO / n_{AS} B3 - LLO))$$

$$(7) [\Theta]_{MRW} \text{ add} = ([\Theta]_{MRW} B3 \cdot (n_{AS} B3 / n_{AS} B3 - MICA) + [\Theta]_{MRW} MICA - E_8C \cdot (n_{AS} MICA - E_8C / n_{AS} B3 - MICA))$$

$[\Theta]_{MRW}$  – mittlere residuale Elliptizität

$[\Theta]_{MRW} \text{ add}$  – Addition der mittleren residualen Elliptizität

$\Theta$  – Elliptizität (deg)

Mw – molekulare Masse des Proteins (Da)

c – Proteinkonzentration (mg/mL)

d – Schichtdicke Küvette (cm)

$n_{AS}$  – Anzahl der Aminosäuren

### Nah-UV-CD-Spektren

Nah-UV-CD-Spektren liefern eine Information über die Umgebung aromatischer Aminosäuren und damit indirekt über die native Struktur von Proteinen. Die Messung der Nah-UV-CD-Spektren erfolgte in einer Quarzglasküvette mit 1 cm Schichtdicke in einem Wellenlängenbereich von 250 nm bis 320 nm. Die Messgeschwindigkeit betrug 50 nm/min in 0.2 nm-Schritten bei 20 °C. Es wurden Spektren bei Proteinkonzentrationen von 0.9 mg/mL für MICA und 1 mg/mL für MICA-E<sub>8</sub>C aufgenommen. Dabei wurden jeweils 32 Spektren akkumuliert und anschließend pufferkorrigiert. Die Umrechnung der Elliptizität  $\Theta$  in die mittlere residuale Elliptizität  $[\Theta]_{MRW}$  erfolgte wie oben beschrieben nach Gleichung (5).

### Analyse thermisch induzierter Entfaltungsübergänge

Die vergleichende Analyse der thermischen Stabilität von MICA und MICA-E<sub>8</sub>C erfolgte im Nah-UV-Bereich. Dazu wurde die Temperatur schrittweise um 1 °C/min in einem Temperaturbereich von 20 °C bis 80 °C erhöht. Mit einer Äquilibrierungszeit von 30 sec wurde alle 0.5 °C ein Datenpunkt aufgenommen. Das Messsignal wurde bei einer Wellenlänge von 291 nm bei einer

Proteinkonzentration von 0.9 mg/mL für MICA und 1 mg/mL für MICA-E<sub>8</sub>C verfolgt und pufferkorrigiert. Die Umrechnung der Elliptizität  $\Theta$  in die mittlere residuale Elliptizität  $[\Theta]_{MRW}$  erfolgte wie oben beschrieben nach Gleichung (5).

## 2.15 Zellbiologische Methoden

### 2.15.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen

Die Kultivierung eukaryontischer Zellen als *Monolayer* erfolgte je nach Verwendungszweck in Zellkulturflaschen mit einer Fläche von 25 cm<sup>2</sup> bzw. 75 cm<sup>2</sup>, in *well*-Platten oder Kammerdeckgläsern. In *well*-Platten und Kammerdeckgläsern wurden Experimente durchgeführt, wohingegen die kontinuierliche Kultivierung in Zellkulturflaschen erfolgte. Die Inkubation der Zellen erfolgte in einem HERA*cell* Inkubator bei 37 °C und 5 % (v/v) CO<sub>2</sub> in einer gesättigten Wasserdampfatosphäre. Das für die jeweilige Zelllinie verwendete Medium ist in Tabelle 2.14 aufgeführt.

### 2.15.2 Passagierung eukaryontischer Zellen

Zur Vermeidung spontaner Transformationen bzw. einer Differenzierung adhärenter Zellen wurden diese vor Erreichen der vollständigen Konfluenz der Zellkulturschale passagiert. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA-Fertiglösung (Invitrogen) bei 37 °C inkubiert. Das Abrunden der Zellen erfolgte nach 2-7 min und wurde lichtmikroskopisch verfolgt. Die Trypsin-EDTA-Fertiglösung wurde entfernt, die Zellen mit frischem Medium von der Gefäßwand abgespült und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Die Zellen wurden dann 1:5 mit Medium verdünnt und in eine frische Zellkulturschale überführt.

Die Passagierung von Suspensionszellen erfolgte im Anschluss an die Bestimmung der Lebendzellzahl. Dazu wurden 10 µL Zellsuspension mit 10 µL Trypan Blau-Lösung versetzt, wobei der Farbstoff nur in tote Zellen einzudringen vermag. Am Lichtmikroskop konnten anschließend die Gesamtzellzahl sowie der Anteil lebender Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt werden. NK92-Zellen wurden bei Erreichen von 600 000 lebenden Zellen/mL, K-562-Zellen bei Erreichen von 1 Million Zellen/mL passagiert. Hierzu wurde ¼ Volumen der Kultur entnommen, in sterilen Zentrifugenröhrchen zentrifugiert (1000 rpm, 10 min, Raumtemperatur), der Überstand abpipettiert und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert. Nach der Überführung der Zellsuspension in Zellkulturflaschen wurden den NK92-Zellen sämtliche Supplemente (Tabelle 2.15) frisch zugesetzt.

### 2.15.3 Präparation einer Kryokultur

Für die Präparation einer Kryokultur wurden adhärenente Zellen in Zellkulturschalen ausgesät und bei einer Konfluenz von 80 % trypsinisiert. Die Trypsinlösung wurde entfernt, die Zellen in *Freezing*-Medium (entsprechend der jeweiligen Zelllinie nach den Angaben von ATCC) resuspendiert und zu je

1 mL in Kryoröhrchen gefüllt. Diese Röhrchen wurden in einem *Cryo 1 °C freezing container* (NALGENE) nach den Angaben des Herstellers über Nacht bei  $-80\text{ °C}$  inkubiert und anschließend für die dauerhafte Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt. Suspensionszellen wurden in sterilen Zentrifugenröhrchen zentrifugiert (1000 rpm, 10 min, Raumtemperatur), der Überstand abpipettiert und die Zellen in *Freezing*-Medium resuspendiert. Die weitere Behandlung erfolgte wie bereits beschrieben.

### 2.15.4 Reaktivierung einer Kryokultur

Zur Reaktivierung einer Kryokultur wurde diese aus dem Stickstofftank entnommen und unter Schwenken im Wasserbad bei  $37\text{ °C}$  schnell aufgetaut. Adhärenz wachsende Zellen wurden unverzüglich in eine Zellkulturschale mit vorgewärmtem Medium überführt, durch Schwenken verteilt und bei  $37\text{ °C}$  im Brutschrank inkubiert. Nach etwa 12 h wurde das Medium gewechselt, um Reste an DMSO aus dem *Freezing*-Medium zu entfernen. Suspensionszellen wurden nach dem Auftauen in ein steriles Zentrifugenröhrchen mit vorgewärmtem Medium überführt. Nach der Zentrifugation der Zellen (1000 rpm, 10 min, Raumtemperatur) wurde das *Freezing*-Medium abpipettiert, die Zellen in frischem Medium resuspendiert und in eine Zellkulturschale überführt.

### 2.15.5 Fluoreszenzmikroskopie

#### 2.15.5.1 Anfertigung von Dauerpräparaten

Die Anfertigung von Dauerpräparaten erfolgte zur Analyse der Bindung des fluoreszenzmarkierten Antikörperfragmentes B3-R<sub>8</sub>CP (B3-Texas Red) (2.13.10) an adhärenz wachsende Zellen bzw. die Analyse der Bindung eines PE-markierten NKG2D-Antikörpers an NK92-Zellen. Für die Anfertigung der Präparate wurden adhärenz wachsende Zellen in *6-well*-Platten überführt, in die zuvor sterile Deckgläschen gelegt wurden, auf denen die Zellen wachsen sollten. Nach Erreichen von 60 % Konfluenz wurde das Medium entfernt und die Zellen zweimal mit je 500  $\mu\text{L}$  PBS gewaschen. Anschließend wurden je 1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  bzw. 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  B3-TexasRed<sup>®</sup> in PBS mit 3 % (v/v) FBS zugesetzt und die Zellen für 60 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen dreimal mit je 500  $\mu\text{L}$  eiskaltem PBS gewaschen und mit 500  $\mu\text{L}$  2 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS für 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln fixiert. Die Zellen wurden anschließend erneut zweimal mit PBS gewaschen und das Deckgläschen in einen Tropfen ProLong<sup>®</sup> Gold *antifade* Reagenz mit DAPI (Invitrogen) auf einen Objektträger gebettet. Das über Nacht bei Raumtemperatur im Dunkeln getrocknete Präparat wurde bis zur fluoreszenzmikroskopischen Analyse bei  $4\text{ °C}$  dunkel gelagert.

Um Dauerpräparate von Suspensionszellen anzufertigen, müssen diese an das Deckgläschen adhärenz werden. Dazu wurden sterile Deckgläschen in eine *6-well*-Platte gelegt und mit je 500  $\mu\text{L}$  0.1 mg/mL poly-D-Lysin-Lösung (in sterilem H<sub>2</sub>O) für 5 min bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Die *wells* wurden anschließend zweimal mit je 500  $\mu\text{L}$  sterilem H<sub>2</sub>O gewaschen und danach für wenigstens 2 h bei Raumtemperatur getrocknet. Im Anschluss wurden die NK92-Zellen in Medium zugesetzt und für 1 h bei  $37\text{ °C}$  im Brutschrank inkubiert. Nach dem Abnehmen des Mediums wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit je 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a-NKG2D-PE in PBS mit 3 % (v/v) FBS

versetzt. Die danach folgenden Wasch- und Fixierungsschritte und die Einbettung der Deckgläschen erfolgten wie oben beschrieben.

Die Dauerpräparate wurden an einem Axiovert 200M Mikroskop mit HBO-Lampe und den dazugehörigen Filtersätzen (Carl Zeiss AG) mikroskopiert.

### 2.15.5.2 Mikroskopische Analyse lebender Zellen

#### Bindung fluoreszenzmarkierter Proteine

In dieser Arbeit wurden verschiedene fluoreszenzmarkierte Proteine hinsichtlich ihrer Fähigkeit, an Zellen zu binden, analysiert. Zum Einsatz kamen mit 5-Carboxyfluorescein-Succinimidylester markiertes B3-R<sub>8</sub>CP, mit GSSG oxidiertes B3-LLO und E<sub>8</sub>C-LLO (E<sub>8</sub>C-LLOox). Die Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen erfolgte wie beschrieben (2.13.10). Für die Fluoreszenzaufnahmen wurden MCF7- und HT-29-Zellen trypsiniert, in frischem Medium resuspendiert und gezählt (Neubauer-Zählkammer). Etwa 20 000 Zellen wurden in jedes *well* eines 8-*well*-Kammerdeckgläschens (*chamber slide*) (Nunc) gesät und über Nacht wachsen gelassen. Am nächsten Tag wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit jeweils 0.1 nM Protein, verdünnt in PBS mit 3 % (v/v) FBS, inkubiert. Die Zellen wurden für jeweils 1 h bei 4 °C mit markiertem B3-R<sub>8</sub>CP bzw. B3-LLO inkubiert. Die Inkubation mit markiertem E<sub>8</sub>C-LLOox erfolgte für 30 – 60 min bei Raumtemperatur. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit PBS/3 % (v/v) FBS gewaschen. Die Fluoreszenzaufnahmen wurden an einem Axiovert 200M Mikroskop mit HBO-Lampe und den dazugehörigen Filtersätzen (Carl Zeiss AG) gemacht.

#### Morphologie Natürlicher Killerzellen

Für die Analyse der Morphologie der Natürlichen Killerzellen NK92 wurden die Zellen gezählt und zu verschiedenen Zellzahlen zwischen 100 000 Zellen/mL bis 1 Mio. Zellen/mL in 12-*well*-Platten ausgesät. Nach 1 bis 2 Tagen Wachstum wurden die Zellen, welche in Multi-Zellaggregaten wachsen (Gong *et al.*, 1994), am Mikroskop analysiert.

### 2.15.6 Analyse der IFN $\gamma$ -Produktion von NK92-Zellen

Die Aktivierung Natürlicher Killerzellen über den NKG2D-Rezeptor kann mit der Produktion von Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) einhergehen. Um dies zu analysieren wurde im ersten Schritt eine Positivkontrolle generiert. Dazu wurden die NK92 gezählt (Neubauer-Zählkammer), zentrifugiert (1000 rpm, 10 min, Raumtemperatur) und in frischem Medium resuspendiert. Für die Stimulation der IFN $\gamma$ -Produktion wurden verschiedene Mengen an Zellen (25 000 bis 1 Mio. Zellen) in einem Endvolumen von 500  $\mu$ L mit 5  $\mu$ g/mL Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) und 1  $\mu$ g/mL Ionomycin versetzt. Nach 2 h Inkubation bei 37 °C im Brutschrank wurden den Ansätzen 20  $\mu$ g/mL Brefeldin A (BFA) zugesetzt. BFA stört die Funktion und Struktur des Golgi-Apparates und verhindert somit die Sekretion des gebildeten IFN $\gamma$  ins Medium. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 12 h bei 37 °C im Brutschrank wurden die Zellen zentrifugiert (Biofuge *fresco*, 2000 rpm, 10 min, Raumtemperatur) und in 25  $\mu$ L reduzierendem SDS-Probenauftragspuffer resuspendiert. Die Proben wurden für 30 min bei 95 °C inkubiert, anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt (2.13.1) und die Produktion von IFN $\gamma$  mittels

Western Blot (2.13.2) überprüft. Alternativ wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und die Produktion von IFN $\gamma$  intrazellulär mit markiertem anti-IFN $\gamma$ -Antikörper durchflusszytometrisch untersucht (2.15.7.1, Intrazelluläres *staining* von Proteinen).

### 2.15.7 Durchflusszytometrie

Die Methode der Durchflusszytometrie ermöglicht die Analyse von Zellen aufgrund ihrer fluoreszierenden und lichtstreuenden Eigenschaften. Dabei werden die Zellen einzeln in einem dünnen Flüssigkeitsstrom an einem Laserstrahl vorbei geleitet. Durch die Vorwärts- und Seitwärtsstreuung des Laserlichtes können Eigenschaften wie Größe und Granularität bestimmt werden, was die Unterscheidung verschiedener Zellpopulationen ermöglicht. Daneben kann auch die Fluoreszenz von Zellen, bei welchen Zellbestandteile (z.B. DNA) oder aber die Zellen selbst mit fluoreszierenden Molekülen oder Proteinen angefärbt wurden, gemessen werden. Befinden sich in der Probe also Fluorophore, so werden diese durch das Laserlicht angeregt und emittieren Photonen. Die durch einen Photodetektor registrierte Anzahl an Photonen ist damit ein Maß für zellgebundene Proteine bzw. in Zellen aufgenommenen Farbstoff.

Sämtliche durchflusszytometrischen Analysen wurden an einem FACS *Calibur* mit Rechner und Steuerungssoftware CellQuest durchgeführt.

#### 2.15.7.1 Bindung fluoreszenzmarkierter Proteine an Zellen

##### Expression von Lewis Y auf Tumorzellen

Die Analyse der Expression des Antigens Lewis Y auf den unterschiedlichen Tumorzelllinien erfolgte mittels durchflusszytometrischer Untersuchung der Bindung des fluoreszenzmarkierten Antikörperfragmentes B3. Die Markierung von B3-R<sub>8</sub>CP erfolgte mit 5-Carboxyfluorescein-Succinimidylester wie beschrieben (2.13.10). Die Zellen wurden trypsinisiert, in Medium resuspendiert und mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Zellen wurden anschließend zu je 100 000 aliquotiert und mit Waschpuffer (PBS/3 % (v/v) FBS) gewaschen. Nach der Zentrifugation (Biofuge *fresco*, 2000 rpm, 10 min, 4 °C) wurden die Zellen in 90  $\mu$ L Waschpuffer resuspendiert und mit 10  $\mu$ L Puffer bzw. Proteinlösung versetzt. Den Zellen wurden insgesamt je 0.01  $\mu$ g, 0.1  $\mu$ g bzw. 1  $\mu$ g Protein zugesetzt. Die Inkubation mit dem fluoreszenzmarkierten Antikörperfragment erfolgte für 1 h bei 4 °C im Dunkeln. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit Waschpuffer gewaschen und nach dem letzten Waschschrift in Resuspensionspuffer (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4) resuspendiert. Die Analyse der Bindung erfolgte über Histogramme am Durchflusszytometer.

##### Expression von MICA auf Tumorzellen

Die Analyse der Expression von MICA auf den verwendeten Tumorzelllinien erfolgte analog zur Analyse der Expression von Lewis Y auf Tumorzellen mittels Durchflusszytometrie. Nach dem Zählen wurden 100 000 Zellen aliquotiert und mit Waschpuffer gewaschen. Nach der Zentrifugation (Biofuge *fresco*, 2000 rpm, 10 min, 4 °C) wurden die Zellen in 90  $\mu$ L Waschpuffer resuspendiert und mit je 10  $\mu$ L Antikörperlösung versetzt. Die Zellen wurden mit je 1  $\mu$ g/mL, 5  $\mu$ g/mL bzw. 10  $\mu$ g/mL PE-markiertem anti-MICA-Antikörper für 1 h bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden

die Zellen dreimal mit Waschpuffer gewaschen, nach dem letzten Waschschrift in Resuspensionspuffer resuspendiert und am Durchflusszytometer analysiert. Die Analyse der Bindung des fluoreszenzmarkierten anti-MICA-Antikörpers erfolgte über Histogramme.

### Expression von NKG2D auf NK92

Die Zelllinie NK92 wurde hinsichtlich der Expression des Rezeptors NKG2D auf der Oberfläche der Zellen analysiert. Hierzu wurden die Zellen gezählt, zu je 100 000 Zellen aliquotiert und mit Waschpuffer (PBS/3 % (v/v) FBS) gewaschen. Nach der Zentrifugation (Biofuge *fresco*, 2000 rpm, 10 min, 4 °C) wurden die Zellen in 70 – 90 µL Waschpuffer resuspendiert und mit je 10 – 30 µL Antikörperlösung versetzt. Der PE-markierte Antikörper anti-NKG2D wurde in Konzentrationen von 0.1 µg/mL bis 20 µg/mL eingesetzt. Als Negativkontrolle diente die gleiche Konzentration an Isotypkontroll-Antikörper. Die Zellen wurden mit den Antikörpern für 1 h bei 4 °C im Dunkeln inkubiert, anschließend dreimal mit Waschpuffer gewaschen, nach dem letzten Waschschrift in Resuspensionspuffer (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4) resuspendiert und am Durchflusszytometer über Histogramme analysiert.

### Analyse der Bindung von fluoreszenzmarkiertem MICA-E<sub>8</sub>C

Um die Funktionalität, also die Bindung von rekombinant hergestelltem MICA-E<sub>8</sub>C an den Rezeptor NKG2D auf NK92-Zellen zu analysieren, wurden die NK92-Zellen mit fluoreszenzmarkiertem MICA-E<sub>8</sub>C inkubiert. Das Protein wurde, wie bereits beschrieben, mit Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 C5-Maleimid markiert (2.13.10). Die gesamte Prozedur der Vorbereitung der Zellen, Inkubation mit Protein, usw. erfolgte analog zur Analyse der Expression von NKG2D auf NK92-Zellen. Es wurden Konzentrationen an fluoreszenzmarkiertem MICA-E<sub>8</sub>C von 10 µg/mL – 500 µg/mL Protein eingesetzt. Entweder erfolgte unmittelbar nach den Waschschriften die Analyse am Durchflusszytometer oder es schlossen sich Kompetitionsexperimente an. Hierzu wurden die mit fluoreszenzmarkiertem MICA-E<sub>8</sub>C inkubierten Zellen ebenfalls dreimal gewaschen mit Waschpuffer. Anschließend wurde unmarkierter anti-NKG2D-Antikörper in Konzentrationen von 25 – 100 µg/mL zugesetzt und für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschriften erfolgte die Resuspension der Zellen in Resuspensionspuffer und die Analyse am Durchflusszytometer.

### Intrazelluläres *staining* von Proteinen

Da die Aktivierung Natürlicher Killerzellen über den Rezeptor NKG2D mit der Expression bestimmter Zytokine und Chemokine einhergeht (Fauriat *et al.*, 2010), wurden die NK92-Zellen hinsichtlich der Produktion von Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), des Makrophagen-Inflammatorischen Proteins-1 $\beta$  (MIP-1 $\beta$ ), Interleukin-8 (IL-8) und RANTES (CCL5) analysiert. Als Positivkontrolle für den IFN $\gamma$ -Nachweis in NK92 wurde die IFN $\gamma$ -Produktion wie beschrieben mit Ionomycin und PMA stimuliert (2.15.6). Um die Produktion der Zytokine und Chemokine in NK92-Zellen zu analysieren, erfolgte entweder eine Inkubation mit den NK92-sensitiven K-562-Zellen oder eine Inkubation mit MICA-E<sub>8</sub>C. Für die Inkubation von NK92 mit K-562 wurden die Zellen gezählt, zentrifugiert (1000 rpm, 10 min, Raumtemperatur) in frischem Medium resuspendiert und in einem Verhältnis von 1:10 (10-facher Überschuss an NK92) gemischt. Nach 1 h Inkubation bei 37 °C im Brutschrank wurden den Ansätzen 20 µg/mL Brefeldin A (BFA) zugesetzt und für 5 h weiter inkubiert. Im Anschluss erfolgte

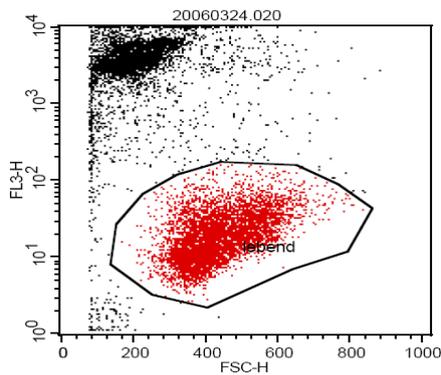
die Fixierung und Permeabilisierung der Zellen mit dem BD Cytotfix/Cytoperm™ Kit nach den Angaben des Herstellers. Daran schloss sich die Färbung der Zellen mit den verschiedenen Antikörpern an. Hierzu wurden je 100 000 Zellen (in 90 µL) jeweils 0.05 µg der Antikörper (anti-IFN $\gamma$ -PE, MIP-1 $\beta$ -PE, IL-8-PE und RANTES-PE) zugesetzt. Die Inkubation der Zellen mit den Antikörpern erfolgte für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit Waschpuffer gewaschen und am Durchflusszytometer analysiert.

Für die Inkubation der NK92-Zellen mit MICA-E $_8$ C wurden jeweils 1 mg/mL des Proteins über Nacht bei 4 °C in poly-D-Lysin-beschichtete 6-well-Platten immobilisiert. Am nächsten Tag wurden den mit MICA-E $_8$ C beschichteten Platten je 250 000 NK92-Zellen/well zugesetzt. Nach dem Zusatz von 20 µg/mL BFA nach 1 h Inkubation bei 37 °C im Brutschrank wurden die Platten weitere 5 h inkubiert. Die Zellen wurden nach der Inkubation wie schon beschrieben behandelt (Fixierung, Permeabilisierung, Färbung mit den Antikörpern, Analyse am Durchflusszytometer). Für die Auswertung wurden die Mediane der Histogramme bestimmt und in einem Balkendiagramm dargestellt.

### 2.15.7.2 Zytotoxizitätsstudien

Bei den Zytotoxizitätsstudien sollte die zytotoxische Wirkung des Immuntoxins B3-LLO sowie des oxidierten E $_8$ C-LLO (E $_8$ C-LLOox) und reduzierten E $_8$ C-LLO (E $_8$ C-LLOred) anhand verschiedener Zelllinien untersucht werden. Zum Einsatz kamen dabei die Lewis Y-positiven Zelllinien MCF7 und SKBR-3 sowie die Lewis Y-negativen Zelllinien HT-29 und HeLa.

Zunächst wurden die Zellen trypsinisiert, gezählt (Neubauer-Zählkammer) und in frischem Medium resuspendiert. Dann wurden die Zellen zu jeweils etwa 25 000 Zellen/well in eine 24-well-Platte überführt und über Nacht im Brutschrank wachsen gelassen. Am nächsten Tag wurde das Medium abgenommen und durch 400 µL frisches Medium ersetzt. Es folgte die Zugabe von 100 µL der jeweiligen Proteinlösung in verschiedenen Konzentrationen. Die Zellen wurden nun für 48 h im Brutschrank weiter inkubiert. E $_8$ C-LLOox wurde durch Modifikation mit GSSG erhalten (2.13.6), E $_8$ C-LLOred wurde durch Reduktion des Proteins für 30 min bei Raumtemperatur mit 5 mM DTT und anschließender Abtrennung des DTT mittels Gelfiltration (PD-10-Säule) erhalten. Nach der 48-stündigen Inkubationszeit wurden die Überstände der einzelnen wells in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Die Zellen wurden mit 150 µL PBS gewaschen, mit 100 µL Trypsin-EDTA-Lösung von den wells abgelöst und mit den jeweiligen Überständen in den Eppendorf-Reaktionsgefäßen vereinigt. Nun folgte die Resuspension der Zellen durch 70-maliges Auf- und Abpipettieren. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, in 250 µL Resuspensionspuffer (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 5 mM CaCl $_2$ , pH 7.4) resuspendiert und bis zur Analyse am Durchflusszytometer auf Eis gelagert. Für die Bestimmung der Anteile lebender bzw. toter Zellen wurden die Zellen mit 100 µL Propidiumjodid-Färbelösung (2.5 µg/mL in PBS) versetzt und für 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen am Durchflusszytometer analysiert. Die Auswertung erfolgte mittels eines *Dotplots*, bei dem die Fluoreszenz (FL3 > 670 nm) gegen die Vorwärtsstreuung (FSC) aufgetragen wurde (Abbildung 2.2).



**Abbildung 2.2:** Auswertung einer Zytotoxizitäts-Messung anhand von *Dotplots*.

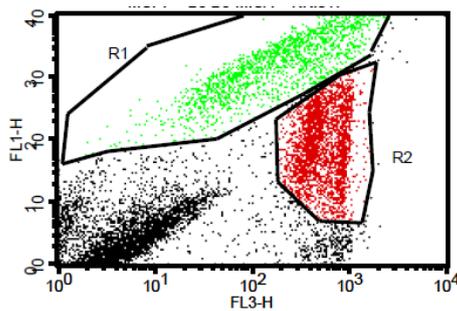
Es wurde dabei die Fluoreszenzintensität von Kanal 3 (>670 nm) gegen die Vorwärtsstreuung (FSC) aufgetragen. Die roten Punkte repräsentieren lebende Zellen, wohingegen schwarze Punkte tote Zellen bzw. Zelltrümmer darstellen. Durch die Aufnahme des Farbstoffes Propidiumjodid weisen tote Zellen eine um ca. Faktor 100 höhere Fluoreszenz gegenüber lebenden Zellen auf.

Für jede Toxinkonzentration wurde die Anzahl der lebenden Zellen bestimmt und auf einer Skala von 0 – 100 % normiert. Die normierten Werte wurden gegen die jeweilige Toxinkonzentration aufgetragen und daraus der  $EC_{50}$ -Wert bestimmt (2.15.7.4).

### 2.15.7.3 Gemischter Zellkulturassay

Der gemischte Zellkulturassay bestand aus Effektorzellen (NK92), Targetzellen (verschiedene Tumorzelllinien) und dem Immunkonjugat B3-MICA bzw. den einzelnen Proteinen in verschiedenen Konzentrationen. Um nach der simultanen Inkubation von Effektor- und Targetzellen bei der Auswertung am Durchflusszytometer zwischen den beiden Zelllinien unterscheiden zu können, wurden die Targetzellen mit 3,3'-Diocetadecyloxycarbocyanin-perchlorat (Dio) *gelabelt*. Das *labelling* der Zellen erfolgte modifiziert nach Piriou *et al.* (2000) und Wex *et al.* (2003). Hierzu wurden die Zellen trypsinisiert, gezählt, in frischem Medium resuspendiert und zu 500 000 Zellen/mL verdünnt. Nun wurde den Zellen 3  $\mu$ M Dio (aus einer 3 mM Stammlösung in DMSO) zugesetzt und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die *gelabelten* Zellen dreimal mit PBS gewaschen, nach dem letzten Waschschritt in NK92-Medium resuspendiert und erneut gezählt. Für den gemischten Zellkulturassay wurden anschließend NK92, welche gezählt und in frischem Medium resuspendiert wurden, mit *gelabelten* Targetzellen in verschiedenen Effektor- zu Targetzell-Verhältnissen in einem Volumen von 100  $\mu$ L gemischt. Anschließend wurden die Proteine in verschiedenen Konzentrationen in PBS in einem Volumen von 30  $\mu$ L zugesetzt. Die Inkubation erfolgte für 2 h, 4 h, 6 h oder 8 h bei 37 °C im Brutschrank. Danach wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, in 100  $\mu$ L PBS resuspendiert und mit 50  $\mu$ L Propidiumjodid-Färbelösung (2.5  $\mu$ g/mL in PBS) versetzt. Nach der Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln wurden die Zellen am Durchflusszytometer analysiert. Die Auswertung erfolgte mittels *Dotplots*, bei denen die Dio-Fluoreszenz (FL1 530  $\pm$  15 nm) gegen die Propidiumjodid-Fluoreszenz (FL3 > 670 nm) aufgetragen wurde (Abbildung 2.3).

Bei der Inkubation von *gelabelten* K-562-Zellen mit NK92 wurden keine Proteine zugesetzt. Da K-562 sehr sensitiv auf NK92 reagieren, wurde mit diesem gemischten Zellkulturassay die Aktivität der NK92 überprüft. Die Prozedur war jedoch die gleiche wie bereits oben beschrieben.



**Abbildung 2.3:** Auswertung einer FACS-Messung anhand von *Dotplots*.

Für die Auswertung wurde die Fluoreszenzintensität von Kanal 1 (Dio) gegen die die Fluoreszenzintensität von Kanal 3 (Propidiumjodid) aufgetragen. Grüne Punkte (R1) repräsentieren lebende Targetzellen, wohingegen rote Punkte (R2) tote Targetzellen darstellen. Bei den schwarzen Punkten handelt es sich um NK92-Zellen.

Für jede Proteinkonzentration wurde die Anzahl lebender Targetzellen bestimmt. Der prozentuale Anteil lebender Zellen wurde gegen die Proteinkonzentration aufgetragen und daraus der  $EC_{50}$ -Wert bestimmt (2.15.7.4). Bei K-562 wurde bei jedem Effektor- zu Targetzell-Verhältnis die Anzahl der lysierten (toten) K-562 bestimmt. Der prozentuale Anteil toter Zellen wurde dabei gegen das Zellverhältnis aufgetragen.

#### 2.15.7.4 Bestimmung des $EC_{50}$ -Wertes

Wie in den Abschnitten 2.15.7.2 und 2.15.7.3 beschrieben, erfolgte nach der Auswertung des Zytotoxizitätstests bzw. des gemischten Zellkulturassays die Bestimmung der prozentualen Anteile der lebenden Zellen bei den jeweiligen Proteinkonzentrationen. Aus dem Kurvenverlauf der Auftragung des prozentualen Anteils lebender Zellen gegen die Proteinkonzentration (logarithmische Skalierung) wurde der  $EC_{50}$ -Wert ermittelt. Die Berechnung erfolgte nach Gleichung (8).

$$(8) \quad y = y_{\min} + \frac{y_{\max} - y_{\min}}{1 + \frac{x}{EC_{50}}}$$

$y$  – Anteil der lebenden Zellen in %

$y_{\min}$  – Anteil der lebenden Zellen bei hohen Proteinkonzentrationen ( $[Protein] \gg EC_{50}$ )

$y_{\max}$  – Anteil der lebenden Zellen bei niedrigen Proteinkonzentrationen ( $[Protein] \ll EC_{50}$ )

$x$  – Proteinkonzentration

$EC_{50}$  – die Proteinkonzentration, bei der 50 % der Zellen noch leben

Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit dem Programm Sigma Plot 8.0. Die Konstanten  $y_{\min}$ ,  $y_{\max}$  und  $EC_{50}$  wurden dabei vom Programm errechnet. Um die einzelnen Messreihen in einem Diagramm darstellen zu können, wurden die absoluten Zellzahlen jeder Messreihe folgendermaßen normiert: von jedem einzelnen Messwert wurde  $y_{\min}$  subtrahiert und das Ergebnis durch  $(y_{\max} - y_{\min})$  dividiert. Dieser Wert wurde für die %-Angabe lebender Zellen mit 100 multipliziert. Die eingesetzten  $y_{\min}$ -Werte entsprachen dabei den Messwerten, bei denen  $< 1\%$  lebende Zellen detektiert wurden.

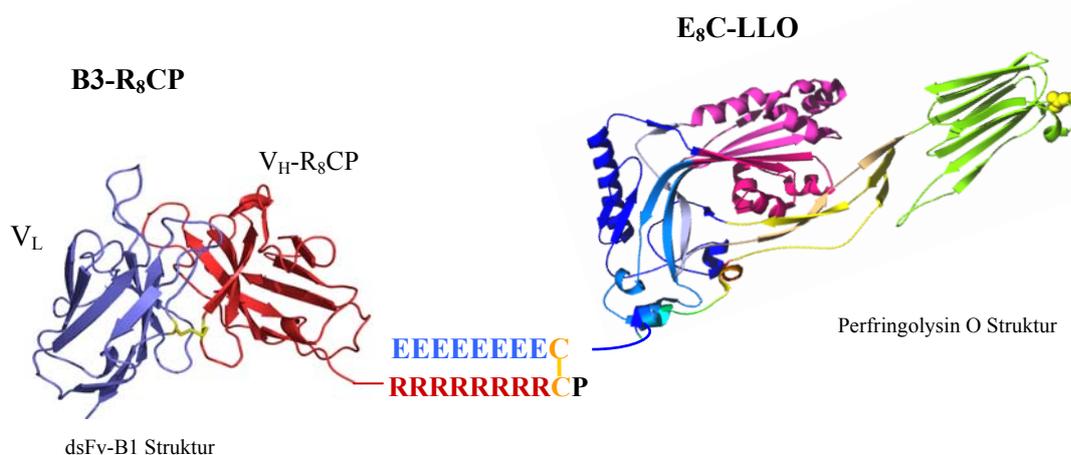
---

## 3 Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und funktionelle Charakterisierung zweier modularer Proteinkomplexe auf Basis eines zellbindenden Antikörperfragmentes (B3-R<sub>8</sub>CP) und je eines funktionellen Proteins; einem Proteintoxin (E<sub>8</sub>C-LLO) und einem Immunliganden (MICA-E<sub>8</sub>C). Auf der einen Seite stand die Herstellung und Charakterisierung des Immuntoxins B3-LLO, welches durch die Proteinkomponente E<sub>8</sub>C-LLO unmittelbar zytotoxisch auf Zellen wirkte. Auf der anderen Seite die Herstellung und Charakterisierung des Immunkonjugates B3-MICA, welches durch den Immunliganden MICA-E<sub>8</sub>C Natürliche Killerzellen rekrutieren und simultan aktivieren sollte. Beide artifizielle bifunktionelle Proteinkonstrukte sollten in ihrer Anwendung zur Eliminierung von Tumorzellen führen. Die Proteinkomplexe wurden mittels eines hoch spezifischen Heterodimerisierungsmotives hergestellt und auf ihre biologische Aktivität hin in Zellkulturexperimenten untersucht.

### 3.1 Das Immuntoxin B3-LLO

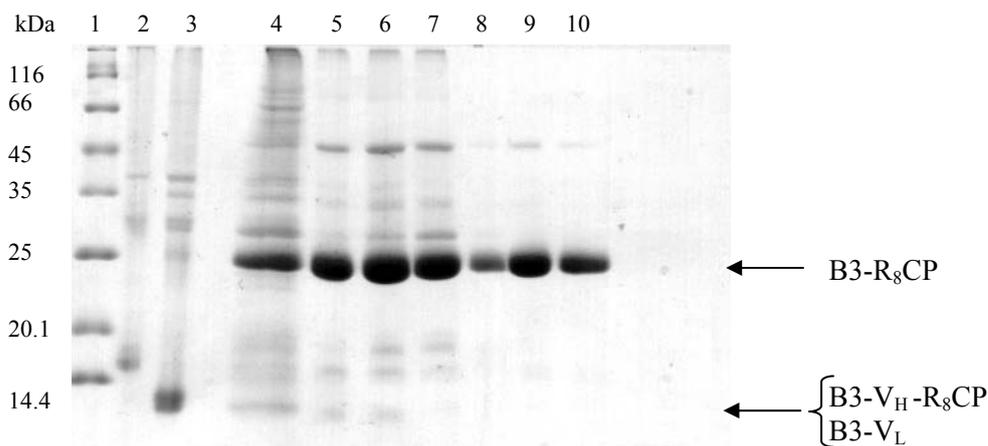
Im Folgenden wird die Herstellung und Reinigung der einzelnen Proteine B3-R<sub>8</sub>CP sowie E<sub>8</sub>C-LLO, die Herstellung und Charakterisierung des Immuntoxins B3-LLO (Abbildung 3.1) sowie die Untersuchung der biologischen Aktivität in Zellkultur beschrieben. Die Proteine B3-R<sub>8</sub>CP und E<sub>8</sub>C-LLO besitzen entgegengesetzt geladene polyionische Fusionspeptide, welche aus 8 Argininen bzw. Glutamaten und jeweils einem Cystein bestehen. Somit können die Proteine über elektrostatische Wechselwirkungen der Fusionsproteine miteinander interagieren und durch die Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen den freien Cysteinen kovalent miteinander verknüpft werden (Richter *et al.*, 2001). Dieses hochspezifische Dimerisierungsmotiv wurde bereits bei der Entwicklung eines Immuntoxins (Kleinschmidt *et al.*, 2003; Kurschus *et al.*, 2004) und zur Modifizierung virusanaloger Partikel mit Antikörperfragmenten (Stubenrauch *et al.*, 2001; May *et al.*, 2002) erfolgreich eingesetzt.



**Abbildung 3.1:** Schematische Darstellung des modularen Immuntoxins B3-LLO, bestehend aus dem Antikörperfragment B3-R<sub>8</sub>CP und dem Proteintoxin E<sub>8</sub>C-LLO. Für die Darstellung wurden die Kristallstrukturen der homologen Proteine dsFv-B1 (PDB:1DSF, Almog *et al.*, 1998) und Perfringolysin O (PDB: 1PFO, Rossjohn *et al.*, 1997) verwendet.

### 3.1.1 Herstellung und Reinigung von B3-R<sub>8</sub>CP

Das tumorspezifische Antikörperfragment B3-R<sub>8</sub>CP diente in dieser Arbeit als zellbindende Komponente. Es bindet dabei spezifisch an das Antigen Lewis Y, welches auf vielen Tumorzellen epithelialen Ursprungs exprimiert wird (Pastan *et al.*, 1991). Die V<sub>H</sub>-Domäne ist C-terminal um die Sequenz (Arg)<sub>8</sub>CysPro verlängert (Stubenrauch *et al.*, 2001), welches die Kopplung an andere Proteine mit Hilfe der polyionischen Fusionspeptide erlaubt. Die Herstellung und Reinigung des B3-R<sub>8</sub>CP erfolgte wie in den Methoden beschrieben nach Stubenrauch *et al.* (2001). Die variablen Domänen der leichten und der schweren Kette des Antikörperfragmentes wurden rekombinant in Form von *inclusion bodies* durch Fermentation von *E. coli* gewonnen. Die Isolierung und Solubilisierung der *inclusion bodies* erfolgte nach Rudolph *et al.* (1997) wie in den Abschnitten 2.13.3.2 und 2.13.3.3 beschrieben. Anschließend wurde B3-R<sub>8</sub>CP anhand etablierter Protokolle renaturiert (2.13.3.4) und gereinigt (2.13.3.9). Aus 41.6 mg solubilisierten *inclusion bodies* von V<sub>L</sub> und 248.3 mg solubilisierten *inclusion bodies* von V<sub>H</sub>-R<sub>8</sub>CP konnten somit 14.8 mg gereinigtes B3-R<sub>8</sub>CP erhalten werden. Der Verlauf der Renaturierung und Reinigung ist in Abbildung 3.2 zusammengefasst.

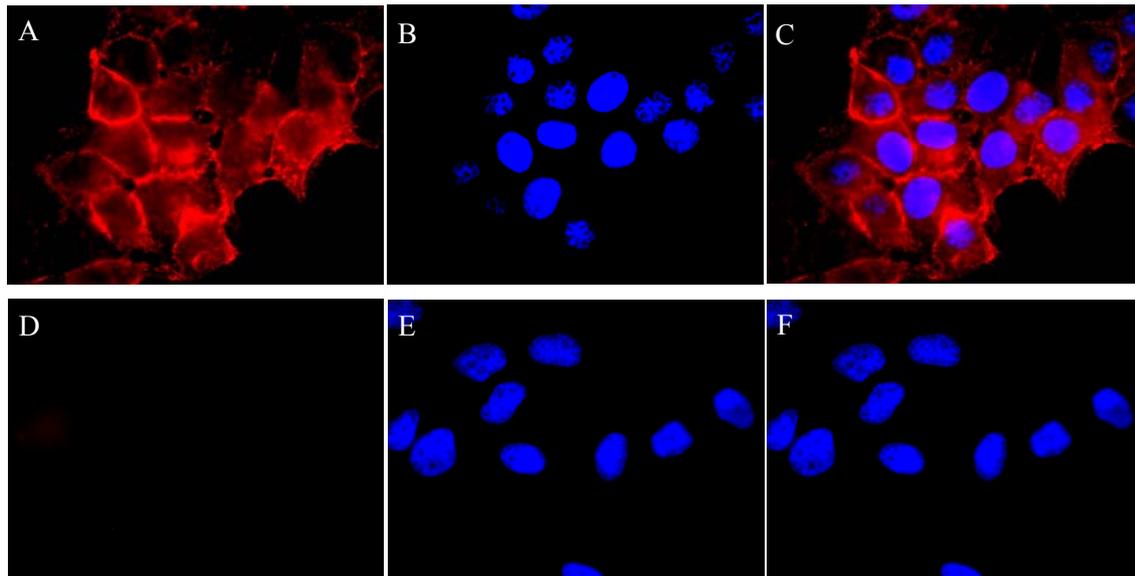


**Abbildung 3.2:** SDS-PAGE zur Analyse der Renaturierung und Reinigung von B3-R<sub>8</sub>CP. Dargestellt ist ein 15 %-iges Coomassie gefärbtes SDS-Gel. Sämtliche Proben wurden mit nicht reduzierendem SDS-Probenpuffer versetzt.

(1) Marker; (2) solubilierte *inclusion bodies* V<sub>H</sub>-R<sub>8</sub>CP; (3) solubilierte *inclusion bodies* V<sub>L</sub>; (4) V<sub>H</sub>-R<sub>8</sub>CP und V<sub>L</sub> nach der Renaturierung; (5,6,7) Elution der Kationentauschermatrix mit linearem NaCl-Gradienten; (8,9,10) gereinigtes Protein nach der Gelfiltration (Superdex 75 *prep grade*).

### 3.1.2 Zelltypspezifität von B3-R<sub>8</sub>CP

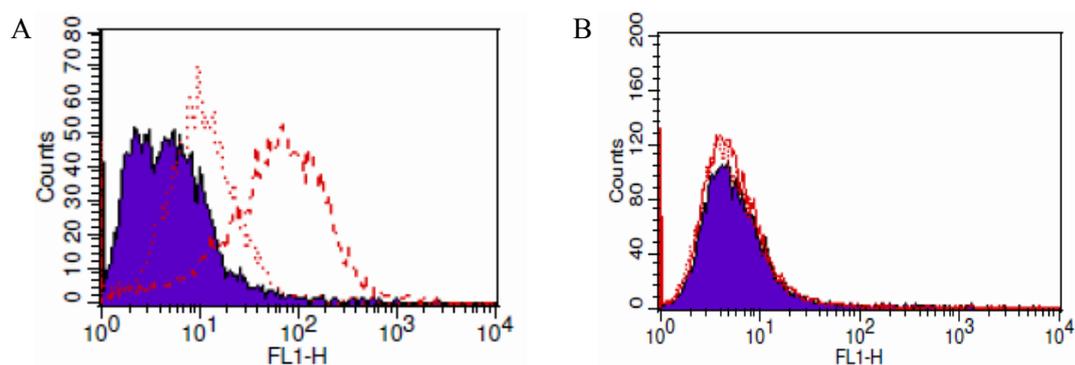
Der Nachweis der Funktionalität und damit der korrekten Assoziation der leichten und schweren Kette des Antikörperfragmentes B3-R<sub>8</sub>CP erfolgte sowohl durch die fluoreszenzmikroskopische als auch durchflusszytometrische Analyse der Bindung an das Antigen Lewis Y auf der Oberfläche von Tumorzellen. Dazu wurde B3-R<sub>8</sub>CP wie in Abschnitt 2.13.10 beschrieben sowohl mit den Fluoreszenzfarbstoffen 5-Carboxyfluorescein-Succinimidylester als auch Texas Red<sup>®</sup> C2-Maleimid markiert. Die qualitative Analyse der Bindung erfolgte durch Fluoreszenzmikroskopie mit MCF7-Zellen (Lewis Y-positiv) und HeLa-Zellen (Lewis Y-negativ) (Abbildung 3.3).



**Abbildung 3.3:** Analyse der Bindung von fluoreszenzmarkiertem B3-R<sub>8</sub>CP (Texas Red) an Lewis Y-positive und Lewis Y-negative Zellen anhand von Fluoreszenzmikroskopie. Für die Anfertigung dieser Dauerpräparate wurden jeweils 3 µg/mL des markierten Antikörpers mit den Zellen inkubiert. Die Lewis Y-positive Zelllinie MCF7 zeigt Texas Red-Fluoreszenz durch die Bindung des Antikörperfragmentes (A). In (B) ist die DAPI-Fluoreszenz der Zellkerne zu sehen, (C) zeigt die Überlagerung der beiden Aufnahmen. Analog dazu wurden Fluoreszenzaufnahmen der Lewis Y-negativen Zelllinie HeLa angefertigt. Es ist keine Bindung des fluoreszenzmarkierten Antikörperfragmentes zu erkennen (D). Aufnahme (E) zeigt die DAPI-Fluoreszenz der Zellkerne und (F) die Überlagerung der beiden Aufnahmen.

Nach 1 Stunde Inkubation konnte eine Färbung der MCF7-Zellen im Zellmembranbereich beobachtet werden (Abbildung 3.3 (A)). Durch die Inkubation der Zellen mit dem fluoreszenzmarkierten Antikörperfragment auf Eis wurde B3-R<sub>8</sub>CP nicht in die Zellen aufgenommen, so dass keine Färbung vesikulärer, intrazellulärer Strukturen erkennbar ist. Von Aufnahmeexperimenten mit B3-R<sub>8</sub>CP ist jedoch bekannt, dass das Antikörperfragment bei 37 °C von MCF7-Zellen internalisiert wird (Frost, 2009). Im Vergleich mit den Lewis Y-negativen HeLa-Zellen konnte hier keine Färbung der Zellen beobachtet werden (Abbildung 3.3 (D)).

Die Ergebnisse von durchflusszytometrischen Analysen bestätigten die Zelltyp-spezifische Bindung des Antikörperfragmentes an Lewis Y-positive Zellen (Abbildung 3.4). Die Zellen wurden, wie in Abschnitt 2.15.7.1 beschrieben, mit 5-Carboxyfluorescein-Succinimidylester-markiertem B3-R<sub>8</sub>CP inkubiert und für die Messung am Durchflusszytometer vorbereitet. Die Bindung von B3-R<sub>8</sub>CP an die Antigen-positiven Zellen äußert sich in der Verschiebung der gesamten Zellpopulation hin zu höheren Fluoreszenzintensitäten (Abbildung 3.4 (A)). Im Gegensatz dazu konnte bei den HeLa-Zellen, welche kein Lewis Y auf der Oberfläche exprimieren, kein Unterschied in der Fluoreszenzintensität der Zellpopulation beobachtet werden (Abbildung 3.4 (B)). Da bei der Untersuchung der Zelltyp-spezifischen Toxizität von B3-LLO noch weitere Zelllinien zum Einsatz kamen, wurden diese ebenfalls hinsichtlich ihrer Eignung, als Lewis Y-positive bzw. -negative Zelllinie zu fungieren, durchflusszytometrisch analysiert. Eine Auflistung der untersuchten Zelllinien sowie eine semi-quantitative Abschätzung der Lewis Y-Expression findet sich in Tabelle 3.1.



**Abbildung 3.4:** Analyse der Bindung von fluoreszenzmarkiertem B3-R<sub>8</sub>CP (5-Carboxyfluorescein-Succinimidylester) an Lewis Y-positive und Lewis Y-negative Zellen mittels Durchflusszytometrie. Die Zellen wurden jeweils mit 0.01 µg bzw. 0.1 µg fluoreszenzmarkiertem Antikörperfragment inkubiert. (A) Lewis Y-positive MCF7-Zellen nach der Inkubation mit 0.01 µg (···) bzw. 0.1 µg (---) fluoreszenzmarkiertem B3-R<sub>8</sub>CP, MCF7 ohne Inkubation mit B3-R<sub>8</sub>CP (lila). (B) Lewis Y-negative HeLa-Zellen nach Inkubation mit 0.01 µg (···) bzw. 0.1 µg (---) fluoreszenzmarkiertem B3-R<sub>8</sub>CP, HeLa ohne Inkubation mit B3-R<sub>8</sub>CP (lila).

Tabelle 3.1: Übersicht über die Oberflächenexpression des Antigens Lewis Y der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien. (+++ viel Lewis Y; + wenig Lewis Y; - kein Lewis Y)

Lewis Y-positive Zelllinien	Expressionslevel Lewis Y	Lewis Y-negative Zelllinien	Expressionslevel Lewis Y
MCF7	+++	HeLa	-
SKBR-3	++	HT-29	- / +
A431	++		

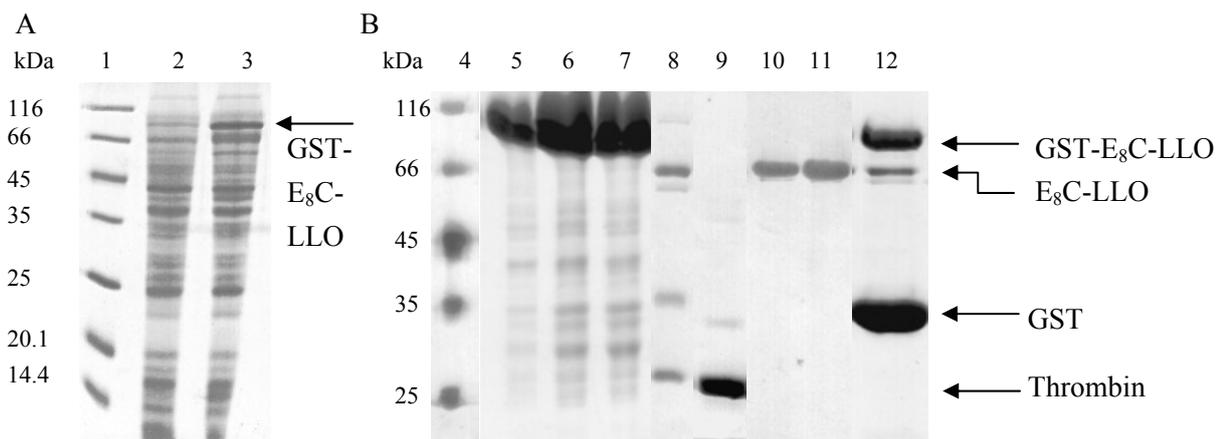
Die Zelllinie MCF7 zeigte die stärkste Lewis Y-Expression, wohingegen auf SKBR-3 und A431 moderate Mengen an Lewis Y vorhanden waren. Die Zelllinie HeLa zeigte keinerlei Antigen Lewis Y auf der Oberfläche. Die Zelllinie HT-29 exprimiert minimale Mengen an Lewis Y zeigte. Da diese Zelllinie häufig als Lewis Y-negative Kontrolle in der Literatur (Kleinschmidt *et al.*, 2003; Günther, 2005; Frost, 2009) verwendet wurde, kam sie auch in dieser Arbeit als Kontrolle zum Einsatz.

### 3.1.3 Expression und Reinigung von E<sub>8</sub>C-LLO

Um eine Expression des Listeriolysin O (LLO) mit N-terminaler polyionischer E<sub>8</sub>C-Fusion zu ermöglichen, wurde das LLO-Gen in den pGEX-4T1-E<sub>8</sub>C-PE38-Vektor kloniert. Die Konstruktion des Expressionsvektors findet sich unter 2.12.9. Bei diesem Vektor wird die Expression von LLO als N-terminalem Fusionspartner von Glutathion-S-Transferase (GST) unter der Kontrolle des *tac*-Promoters realisiert. Das E<sub>8</sub>C-LLO-Konstrukt mit N-terminaler GST-Fusion und C-terminalem His<sub>6</sub>-tag ist schematisch in Abbildung 2.1 dargestellt. Neben der Steigerung der Expressionsrate ermöglicht die GST-Fusion eine Affinitätsreinigung an immobilisiertem GSH (Smith & Johnson, 1988). Eine Steigerung der Expressionsrate wurde außerdem durch die Absenkung der Inkubationstemperatur der

*E. coli*-Zellen von 37 °C auf 24 °C nach der Induktion der Proteinexpression erreicht. Die Expression im Schüttelkolben erfolgte wie in Abschnitt 2.12.10.5 beschrieben.

Der Zellaufschluss nach der Expression erfolgte wie in 2.13.3.1 beschrieben mit 25 g Biofeuchtmasse (*E. coli* BL21 (DE3) pGEX-4T1-E<sub>8</sub>C-LLO). Der erhaltene lösliche Rohextrakt wurde auf eine GSH-Sepharose-Säule aufgetragen (2.13.3.8), wobei das Fusionsprotein GST-E<sub>8</sub>C-LLO spezifisch über die GST an das Chromatographiematerial bindet. Nach der Elution und einer Dialyse gegen Spaltungspuffer erfolgte ein Thrombin-Verdau, um die GST-Fusion abzuspalten. Unter optimierten Pufferbedingungen (20 mM Tris, 200 mM NaCl, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 80 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.5 mM KCl) wurde bereits nach 4 h ein Großteil des GST-E<sub>8</sub>C-LLO gespalten. Im nächsten Schritt wurde die Proteinlösung auf eine NiNTA-Säule aufgetragen, an der ungespaltenes GST-E<sub>8</sub>C-LLO und E<sub>8</sub>C-LLO über den His<sub>6</sub>-tag banden, wohingegen sich Thrombin und GST im Durchfluss befanden. Im letzten Reinigungsschritt wurde die Proteinlösung erneut auf eine GSH-Sepharose-Säule aufgetragen. Dabei fand sich E<sub>8</sub>C-LLO im Durchfluss, wohingegen GST-E<sub>8</sub>C-LLO an die Säule band. Auf diese Weise konnten aus 25 g Biofeuchtmasse 59 mg gereinigtes E<sub>8</sub>C-LLO gewonnen werden. Eine Übersicht über die Expression und Reinigung ist in Abbildung 3.5 zu finden.



**Abbildung 3.5:** SDS-PAGE zur Analyse der Expression und Reinigung von E<sub>8</sub>C-LLO. Dargestellt ist in (A) ein 15 %-iges Coomassie gefärbtes SDS-Gel, in (B) Ausschnitte 12 %-iger SDS-Gele. Alle Gelproben wurden mit reduzierendem SDS-Probenpuffer versetzt.

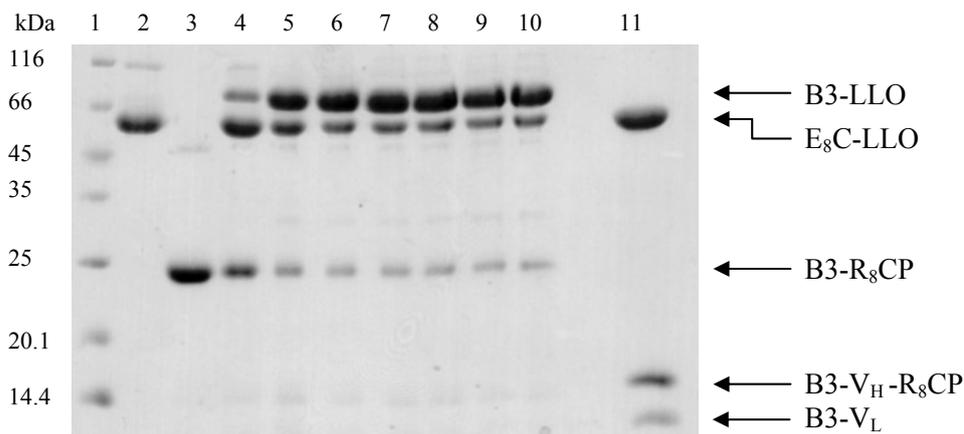
(A) (1) Marker; (2) Zellysate vor der Induktion; (3) Zellysate 4 h nach der Induktion;

(B) (4) Marker; (5,6,7) Elution des GST-E<sub>8</sub>C-LLO von der GSH-Sepharose-Matrix; (8) Thrombin-Verdau; (9) Durchfluss der NiNTA, welcher Thrombin enthält; (10,11) Durchfluss der GSH-Sepharose-Matrix, welcher E<sub>8</sub>C-LLO enthält; (12) Elution von der GSH-Sepharose-Matrix mit enthaltenem GST-E<sub>8</sub>C-LLO, GST und Resten von E<sub>8</sub>C-LLO.

### 3.1.4 Herstellung des Immuntoxins B3-LLO

In dieser Arbeit sollte das modulare Immuntoxin B3-LLO hergestellt werden, dessen einzelne Komponenten durch gerichtete Assoziation und kovalente Verknüpfung mittels polyionischer Fusionspeptide verknüpft werden sollten. Die Kopplung des B3-R<sub>8</sub>CP an das Toxin E<sub>8</sub>C-LLO ist an gewisse Bedingungen geknüpft. Um eine gerichtete Assoziation der entgegengesetzt geladenen Fusionspeptide zu erreichen, ist eine niedrige Ionenstärke ( $\leq 100$  mM NaCl) im Reaktionspuffer nötig (Richter *et al.*, 2001). Da die elektrostatischen Wechselwirkungen der entgegengesetzt geladenen Fusionspeptide für

eine unter physiologischen Bedingungen (150 mM NaCl) stabile Assoziation nicht ausreichen, besitzen beide polyionischen Fusionen ( $R_8C$  und  $E_8C$ ) zusätzliche ein freies Cystein. Diese bilden unter oxidierenden Bedingungen eine Disulfidbrücke und gewährleisten somit eine kovalente Verknüpfung der beiden polyionischen Fusionsproteine. Die Kopplung von  $B3-R_8CP$  und  $E_8C-LLO$  erfolgte wie in Kapitel 2.13.3.13 beschrieben. Beide Proteine wurden zunächst mit GSH vorreduziert. Dies ist zum einen notwendig, da nach der Renaturierung des  $B3-R_8CP$  ein abschließender Oxidationsschritt mit GSSG erfolgt, wodurch die Thiolgruppe des freien Cysteins oxidiert wird. Zum anderen ist es nötig, da bei einer längeren Lagerung der Proteine Homodimere entstehen können, die jedoch unter leicht reduzierenden Bedingungen unverzüglich in Monomere zerfallen. Im Anschluss wurden die Proteine äquimolar gemischt und  $CuCl_2$  zugesetzt, was die Oxidation der Thiolgruppen zu einer Disulfidbrücke durch Luftsauerstoff katalysiert. In ersten Kopplungsversuchen wurden pH-Wert und NaCl-Konzentration variiert, um optimale Reaktionsbedingungen zu ermitteln, unter denen sowohl die Proteine stabil bleiben als auch eine gute Ausbeute an Kopplungsprodukt möglich ist. Nach unterschiedlichen Inkubationszeiten wurden Proben entnommen, mit reduzierendem bzw. nicht reduzierendem SDS-Probenauftragspuffer versetzt und mittels SDS-PAGE analysiert (Abbildung 3.6).



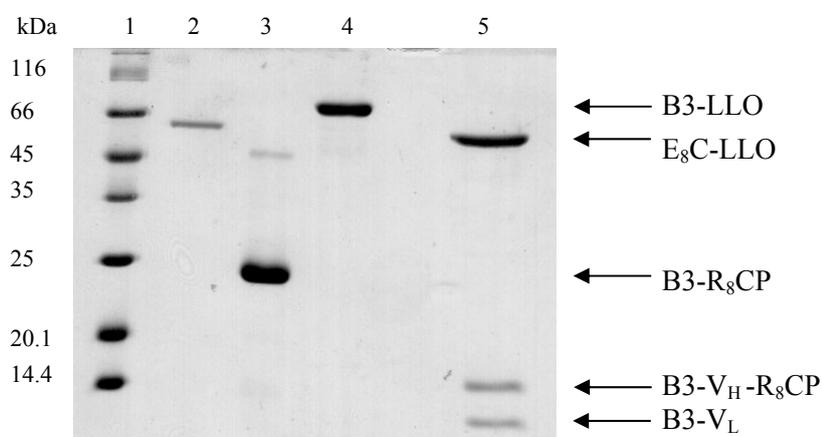
**Abbildung 3.6:** Kinetik der Kopplung von  $B3-R_8CP$  und  $E_8C-LLO$ . Dargestellt ist ein 15 %-iges Coomassie gefärbtes SDS-Gel. Die Reaktion erfolgte in 25 mM  $NaH_2PO_4/Na_2HPO_4$ , 100 mM NaCl, 1  $\mu$ M  $CuCl_2$ , pH 8.5 bei einer Proteinkonzentration von jeweils 3  $\mu$ M.

(1) Marker; (2)  $E_8C-LLO$ ; (3)  $B3-R_8CP$ ; (4)-(10) Kopplungsansatz nach 0 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 20 h; (11) Reaktionsansatz nach 20 h.

Die Proben (2)-(10) wurden mit nicht reduzierendem SDS-Probenpuffer versetzt, Probe (11) mit reduzierendem SDS-Probenpuffer.

Wie in Abbildung 3.6 zu sehen ist, wird unter den gegebenen Bedingungen die maximale Ausbeute an  $B3-LLO$  bereits nach etwa 6 h erreicht. Für die präparative Kopplung von  $B3-R_8CP$  und  $E_8C-LLO$  wurden die Proteine vorreduziert, in äquimolarem Verhältnis gemischt und in 25 mM  $NaH_2PO_4/Na_2HPO_4$ , 100 mM NaCl, 1  $\mu$ M  $CuCl_2$ , pH 8.5 für 20 h inkubiert. Die Inkubation über Nacht ermöglichte am nächsten Tag die direkt auf die Kopplung folgende Reinigung des Immuntoxins wie in Abschnitt 2.13.3.13 beschrieben. Die nicht gekoppelten Komponenten wurden dabei über einen Kationentauscher abgetrennt. Nicht gekoppeltes  $E_8C-LLO$  befand sich im Durchfluss der Säule, wohingegen  $B3-R_8CP$  mit seinem positiv geladenen  $R_8CP-tag$  bei höheren NaCl-Konzentrationen von der Säule eluierte als  $B3-LLO$ . Aus 1.59 mg  $B3-R_8CP$  und 3.43 mg  $E_8C-LLO$  konnten auf diese Weise

2.17 mg gereinigtes B3-LLO gewonnen werden. Die einzelnen Schritte der Präparation des Immuntoxins können Abbildung 3.7 entnommen werden.



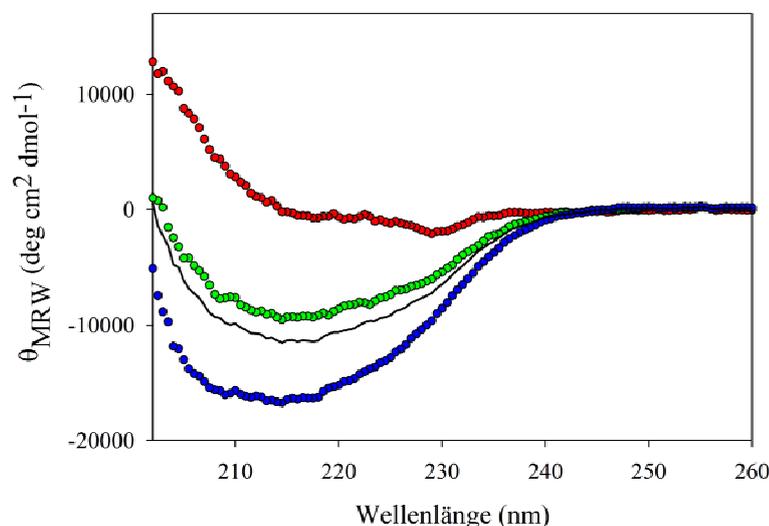
**Abbildung 3.7:** Herstellung des Immuntoxins B3-LLO. Gezeigt ist ein 15 %-iges Coomassie gefärbtes SDS-Gel.

(1) Marker; (2) E<sub>8</sub>C-LLO; (3) B3-R<sub>8</sub>CP; (4) B3-LLO nach der Reinigung über den Kationentauscher und der Abtrennung der nicht gekoppelten Proteine; (5) gereinigtes B3-LLO.

Die Proben (2)-(4) wurden mit nicht reduzierendem SDS-Probenpuffer versetzt, Probe (5) mit reduzierendem SDS-Probenpuffer.

### 3.1.5 Untersuchungen zur Sekundärstruktur des Immuntoxins

Durch die Analyse der Sekundärstruktur des B3-LLO sollte geklärt werden, inwiefern die Assoziation der Proteine und die kovalente Verknüpfung einen Einfluss auf die strukturelle Integrität der Proteine hat. Sofern die Kopplung einen Einfluss auf die strukturellen Eigenschaften hat, sollte dies mittels der CD-Spektroskopie analysierbar sein. In Abbildung 3.8 sind die Fern-UV-CD-Spektren der einzelnen Proteine sowie das des Konjugates B3-LLO dargestellt.



**Abbildung 3.8:** Fern-UV-CD-Spektren von B3-R<sub>8</sub>CP (●), E<sub>8</sub>C-LLO (●) und dem Immuntoxin B3-LLO (●). Alle Proteine waren in 25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 50 mM NaCl, pH 7.4 gelöst. Die Spektren wurden bei 20 °C in einer Quarzglaszuvette mit 1 mm Schichtdicke aufgenommen. Das nach der Addition der mittleren residualen Elliptizität von B3-R<sub>8</sub>CP und E<sub>8</sub>C-LLO erhaltene Spektrum (—) ist ebenfalls dargestellt.

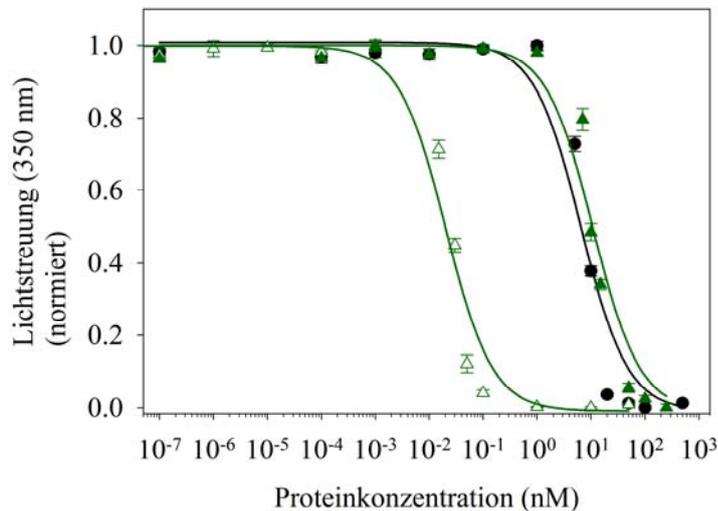
Die gemessene Elliptizität wurde nach der in Abschnitt 2.14.3 angegebenen Formel in die mittlere residuale Elliptizität umgerechnet. Die Spektren der Proteine unterscheiden sich sehr stark voneinander. So zeigt das Spektrum des Antikörperfragmentes weder ein typisches  $\alpha$ -helikales- noch ein typisches  $\beta$ -Faltblatt-Spektrum. Die Messung war jedoch mit Protein aus unterschiedlichen Präparationen stets reproduzierbar. Das Spektrum von E<sub>8</sub>C-LLO weist auf einen hohen Anteil an  $\beta$ -Faltblatt hin. Das Spektrum des Konjugates B3-LLO zeigt in Hinblick auf die Messgenauigkeit einen annähernd ähnlichen Verlauf wie das durch Addition der Einzelspektren von B3-R<sub>8</sub>CP und E<sub>8</sub>C-LLO erhaltene Spektrum. Aus den Ergebnissen kann man somit schlussfolgern, dass die Assoziation und kovalente Verknüpfung der Proteine über polyionische Fusionspeptide vermutlich keinen größeren Einfluss auf die Sekundärstrukturelemente der Proteine hat.

### 3.1.6 Hämolytische Aktivität von LLO-Varianten

Listeriolysin O gehört zur Proteinfamilie der so genannten *cholesterol-dependent pore-forming cytolysins* (CDCs) (Bhakdi *et al.*, 1985; Bayley, 1997; Tweten, 2005), was deren Fähigkeit beschreibt, an cholesterinhaltige Membranen zu binden. Nach der Membranbindung oligomerisieren 20 bis 80 Monomere und bilden eine ringförmige Pore in der Membran (Bhakdi *et al.*, 1985; Bayley, 1997, Dramsi & Cossart, 2002). In diese Membranbindung ist eine am C-Terminus befindliche konservierte Sequenz aus 11 Aminosäuren involviert, welche zudem für die zytolytische Aktivität verantwortlich ist (Jacobs *et al.*, 1999; Dramsi & Cossart, 2002). Daher war nicht davon auszugehen, dass die N-terminale Modifikation des LLO eine Auswirkung auf dessen hämolytische Aktivität, also die Fähigkeit zur Zerstörung der Membran nativer Erythrozyten, besitzt. Die hämolytische Aktivität des LLO ist jedoch noch von anderen Bedingungen abhängig. So besitzen die CDCs ein singuläres Cystein innerhalb des konservierten Undekapeptides, dessen Oxidationsstatus eine wichtige Rolle bei der lytischen Aktivität spielt. Die Oxidation der Thiolgruppe führt zum Verlust der Aktivität, die jedoch durch Reduktion vollständig reversiert werden kann (Geoffroy *et al.*, 1987; Giammarini *et al.*, 2003). Zudem spielt für die lytische Aktivität der pH-Wert eine Rolle (Geoffroy *et al.*, 1987, Glomski *et al.*, 2002, Giammarini *et al.*, 2003), da LLO unter sauren Bedingungen eine um bis zu Faktor 10 höhere Aktivität besitzt als im neutralen pH-Bereich (Glomski *et al.*, 2002).

Zur Beurteilung der Funktionalität der LLO-Varianten, insbesondere die der E<sub>8</sub>C-LLO-Variante, wurde ihre hämolytische Aktivität gegenüber nativen Erythrozyten *in vitro* analysiert, wie in Kapitel 2.13.12 beschrieben. LLO wurde freundlicherweise von Dr. Stefan Frost, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, zur Verfügung gestellt. R<sub>6</sub>C-LLO, welches mit seinem positiv geladenen R<sub>6</sub>C-tag als weiteres Kontrollprotein diente, wurde von Dr. Constanze Günther, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, präpariert und ebenfalls freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Als Messsignal diente das Streulicht der Zellen, welches durch die Lyse der Zellen mit steigenden Proteinkonzentrationen abnimmt. Die hämolytische Aktivität wurde für LLO in oxidiertem Form (LLOox) unter neutralen Bedingungen bestimmt. Des Weiteren in reduzierter Form (LLOred) unter sauren und neutralen Bedingungen. Ebenso wurde für die polyionische Variante E<sub>8</sub>C-LLO verfahren. Die polyionische Variante R<sub>6</sub>C-LLO wurde vergleichend in reduzierter Form unter sauren und neutralen Bedingungen untersucht. Für B3-LLO war die Bestimmung der hämolytischen Aktivität nur in

oxidiert Form unter neutralen Bedingungen möglich. In Abbildung 3.9 sind die Titrationskurven von B3-LLO sowie LLOox und LLOred unter neutralen Bedingungen dargestellt.



**Abbildung 3.9:** Untersuchung der hämolytischen Aktivität von LLO und Bestimmung der  $EC_{50}$ -Werte unter neutralen Bedingungen in oxidiert Form (LLOox und B3-LLO) bzw. reduzierter Form (LLOred). Zur Bestimmung der  $EC_{50}$ -Werte wurden verschiedene Konzentrationen an Protein mit einer Erythrozyten-suspension gemischt. Nach 30 min bei 37 °C wurde die Lichtstreuung bei 350 nm gemessen. Das Signal nimmt durch die Lyse der Zellen mit steigenden Proteinkonzentrationen ab.

Es sind die Titrationskurven für reduziertes LLO ( $\Delta$ ), für B3-LLO ( $\bullet$ ) und oxidiertes LLO ( $\blacktriangle$ ) unter neutralen Bedingungen (pH 7.4) gezeigt. Alle Messungen wurden dreifach ausgeführt, die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung des Mittelwertes. Die Linien stellen die Anpassung an die experimentell gewonnenen Daten dar.

Die in Tabelle 3.2 aufgeführten  $EC_{50}$ -Werte für die einzelnen Proteine zeigen, dass LLO,  $E_8C$ -LLO sowie  $R_6C$ -LLO in reduzierter Form unter neutralen Bedingungen (pH 7.4) ähnliche  $EC_{50}$ -Werte aufweisen.

Tabelle 3.2: Übersicht über die durch Messung der hämolytischen Aktivität bestimmten  $EC_{50}$ -Werte der verschiedenen Proteine unter verschiedenen Bedingungen.

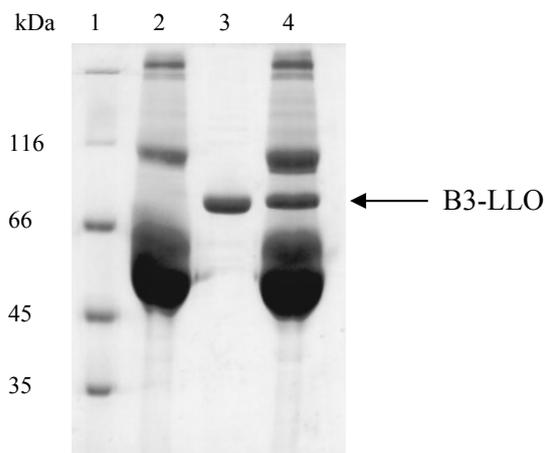
Toxin	$EC_{50}$ -Werte (pM)		
	reduziert (pH 7.4)	reduziert (pH 5.5)	oxidiert (pH 7.4)
LLO	$21.9 \pm 7$	$7 \pm 0.3$	$10.9 \cdot 10^3 \pm 1.7 \cdot 10^3$
$E_8C$ -LLO	$38 \pm 7$	$5.6 \pm 0.7$	$39.3 \cdot 10^3 \pm 11.7 \cdot 10^3$
$R_6C$ -LLO	$9.2 \pm 2$	$5.2 \pm 0.8$	-----
B3-LLO	-----	-----	$6.5 \cdot 10^3 \pm 1.2 \cdot 10^3$

$R_6C$ -LLO zeigt mit  $9.2 \pm 2$  pM den niedrigsten  $EC_{50}$ -Wert, was auf eine Wechselwirkung des positiv geladenen Arginin-*tags* mit der negativ geladenen Oberfläche der Erythrozyten hinweisen könnte. Dem gegenüber zeigt  $E_8C$ -LLO einen etwas höheren  $EC_{50}$ -Wert, was wiederum auf eine Abstoßung der negativ geladenen Zelloberfläche mit dem negativ geladenen  $E_8C$ -*tag* zurückzuführen sein könnte. Dennoch ist der  $EC_{50}$ -Wert für  $E_8C$ -LLO unter neutralen Bedingungen mit  $38 \pm 7$  pM nahezu identisch zum  $EC_{50}$  für LLO ( $21.9 \pm 7$  pM). Unter sauren Bedingungen (pH 5.5) weisen sämtliche LLO-Varianten nahezu identische  $EC_{50}$ -Werte auf. Der polyionische  $E_8C$ -*tag* des  $E_8C$ -LLO hat vermutlich keinen Einfluss mehr hinsichtlich einer möglichen elektrostatischen Wechselwirkung mit der

Zelloberfläche, da bei einem pH-Wert von 5.5 die Carboxylgruppen der Glutamate partiell protoniert vorliegen sollten. Allerdings sind die Unterschiede in den  $EC_{50}$ -Werten bei den reduzierten Proteinen unter sauren und neutralen Bedingungen nicht so groß wie erwartet. Bei den oxidierten LLO-Varianten und B3-LLO liegen die  $EC_{50}$ -Werte alle im nanomolaren Bereich und damit bis zu 1000-fach höher als unter reduzierenden Bedingungen. Die Oxidation des singulären Cysteins führt damit zu einem dramatischen Verlust an hämolytischer Aktivität. Der Vergleich der  $EC_{50}$ -Werte von isoliertem oxidiertem LLO bzw.  $E_8C$ -LLO im Kontext des Heterodimers B3-LLO zeigt, dass  $E_8C$ -LLO nach der Assoziation mit B3- $R_8CP$  funktionell ist. Insgesamt kann davon ausgegangen werden, dass die polyionische  $E_8C$ -Fusion keine Auswirkung auf die lytische Aktivität des LLO hat.

### 3.1.7 Untersuchung der Stabilität von B3-LLO im Serum

B3-LLO stellt ein potenzielles Therapeutikum dar, welches im lebenden Organismus bzw. in der Zellkultur wirksam sein soll. Es muss daher gegenüber den im Serum befindlichen Proteasen eine ausreichende Stabilität besitzen. Um dies zu untersuchen, wurde B3-LLO wie in Kapitel 2.13.11 beschrieben, für 11 h mit 10 % (v/v) fötalem, nicht hitzeinaktiviertem Kälberserum inkubiert. Anschließend erfolgte die Analyse mittels SDS-PAGE (Abbildung 3.10).



**Abbildung 3.10:** Analyse der Stabilität von B3-LLO in fötalem Kälberserum. Sämtliche Proben wurden mit nicht reduzierendem Probenpuffer versetzt. Gezeigt ist ein 8 %-iges Coomassie gefärbtes SDS-Gel.

(1) Marker; (2) 10 % (v/v) FBS + 90 % (v/v) PBS; (3) 90 % (v/v) B3-LLO (3 µg) + 10 % (v/v) PBS; (4) 90 % (v/v) B3-LLO (3 µg) + 10 % (v/v) FBS

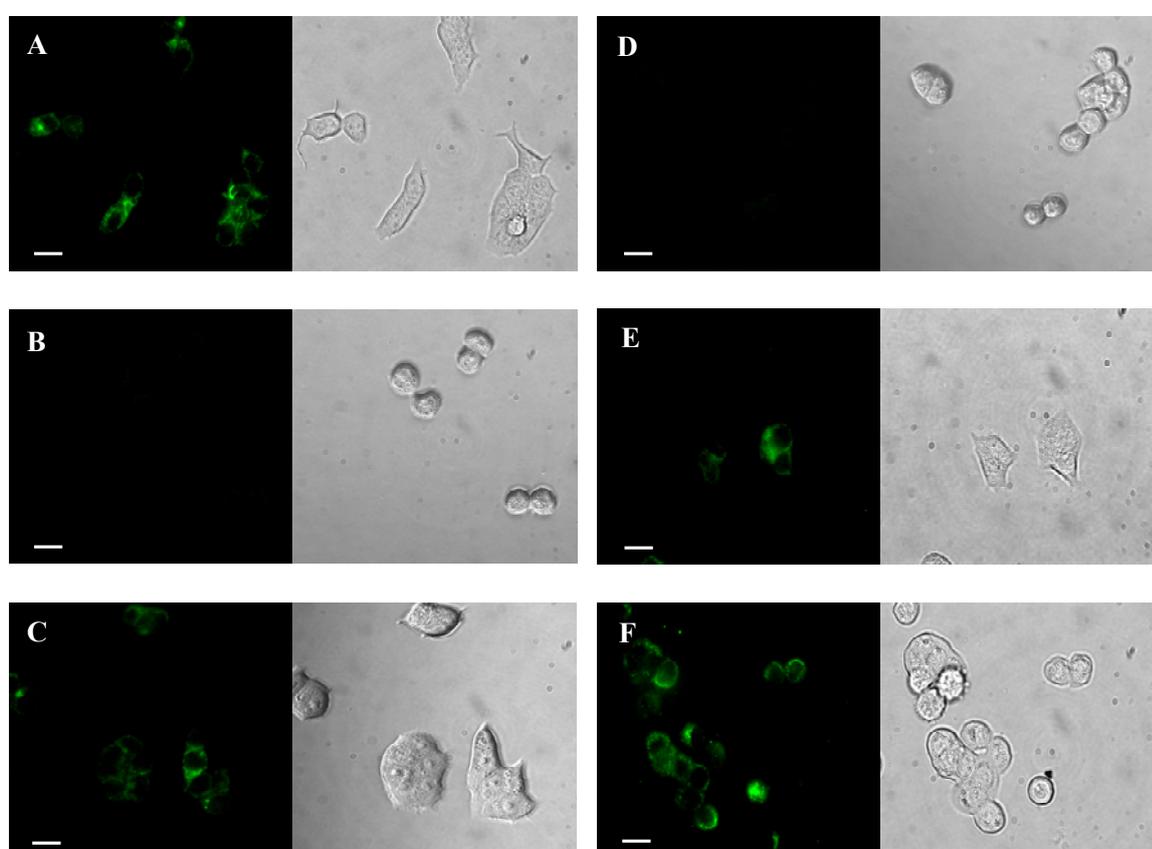
Alle Proben wurden vor der Analyse für 11 h bei 37 °C inkubiert.

Anhand des SDS-Geles ist ersichtlich, dass es zu keinem proteolytischen Abbau des Immuntoxins B3-LLO durch die Inkubation mit fötalem Kälberserum kommt. Aus diesem Grund sollte eine ausreichende Stabilität des B3-LLO zur Untersuchung der biologischen Aktivität in Zellkultur gewährleistet sein.

### 3.1.8 Zellbindung des Immuntoxins

Wie bereits erwähnt, gehört LLO zu einer Proteinfamilie, welche die Fähigkeit besitzt, an cholesterinhaltige Membranen binden zu können (Bhakdi *et al.*, 1985; Bayley, 1997; Tweten, 2005). Monomere der Proteine binden dabei an die Zellmembran und bilden unter Oligomerisierung eine ringförmige Pore (Bhakdi *et al.*, 1985; Bayley, 1997, Dramsi & Cossart, 2002). Die Fähigkeit des LLO, Poren in Membranen zu bilden, ist damit auch die Grundlage der zytolytischen Aktivität des Proteins. Es muss

also gewährleistet sein, dass das Immuntoxin B3-LLO spezifisch über das Antikörperfragment und nicht über LLO an Zellen bindet und somit eine Zelltyp-spezifische Toxizität aufweist. Für diese Untersuchung wurden B3-R<sub>8</sub>CP, E<sub>8</sub>C-LLO und B3-LLO hinsichtlich ihrer Fähigkeit analysiert, an Zellen zu binden. Alle Proteine wurden, wie in Kapitel 2.13.10 beschrieben, mit 5-Carboxyfluorescein-Succinimidylester fluoreszenzmarkiert. In reduziertem Zustand weist E<sub>8</sub>C-LLO eine um bis zu 1000-fach höhere zytolytische Aktivität auf als in oxidiertem Zustand (3.1.6). Um keine sofortige Zellyse herbeizuführen, wurden daher die Thiolgruppen der Cysteine des E<sub>8</sub>C-LLO und B3-LLO quantitativ mit GSSG oxidiert (2.13.6 bzw. 2.13.3.13). Im Anschluss wurden Lewis Y-positive MCF7 sowie Lewis Y-negative HT-29-Zellen mit den fluoreszenzmarkierten Proteinen inkubiert und am Fluoreszenzmikroskop analysiert wie beschrieben (2.15.5.2).



**Abbildung 3.11:** Fluoreszenzaufnahmen von MCF7- und HT-29-Zellen zur Analyse der Bindung von B3-R<sub>8</sub>CP, GSSG-oxidiertem E<sub>8</sub>C-LLO und B3-LLO. Alle Proteine wurden mit 5-Carboxyfluorescein-Succinimidylester fluoreszenzmarkiert. Die Zellen wurden mit jeweils 0.1 nM des jeweiligen Proteins inkubiert. **(A)** Lewis Y-positive MCF7-Zellen zeigen eine grüne Fluoreszenz durch die Bindung des markierten Antikörperfragmentes B3-R<sub>8</sub>CP. **(B)** HT-29-Zellen sind Lewis Y-negativ und zeigen daher keine Fluoreszenz nach der Inkubation mit B3-R<sub>8</sub>CP. **(C)** MCF7 zeigen ebenfalls eine grüne Fluoreszenz nach der Bindung des Immuntoxins B3-LLO, wohingegen HT-29 keine zeigt **(D)**. Das Zytolysin E<sub>8</sub>C-LLO interagiert Zelltyp-unspezifisch mit beiden Zelllinien, sowohl MCF7 **(E)** als auch HT-29 **(F)**. Auf der linken Seite sind jeweils die Fluoreszenzaufnahmen, auf der rechten Seite die korrespondierenden Durchlichtaufnahmen zu sehen. Der weiße Balken entspricht 20  $\mu$ m.

In Abbildung 3.11 sind die Fluoreszenzaufnahmen der Zelllinien MCF7 und HT-29 nach der Inkubation mit fluoreszenzmarkiertem B3-R<sub>8</sub>CP, E<sub>8</sub>C-LLO und B3-LLO gezeigt. Wie erwartet, zeigen

die Lewis Y-positiven MCF7-Zellen eine grüne Fluoreszenz durch die Bindung des Antikörperfragmentes (Abbildung 3.11 (A)), wohingegen die Lewis Y-negativen HT-29-Zellen keine Bindung und damit keine Fluoreszenz zeigen (Abbildung 3.11 (B)). Doch auch nach der Inkubation mit B3-LLO zeigt HT-29 keine grüne Fluoreszenz (Abbildung 3.11 (D)), was darauf zurückzuführen ist, dass im Kontext des B3-LLO durch LLO keine unspezifische Bindung an Zellen erkennbar ist. Möglicherweise stört die Kopplung an das Antikörperfragment die Interaktion des E<sub>8</sub>C-LLO mit der Zellmembran, denn im Gegensatz zu B3-LLO interagiert das isolierte Protein E<sub>8</sub>C-LLO sowohl mit MCF7- (Abbildung 3.11 (E)), als auch mit HT-29-Zellen (Abbildung 3.11 (F)). Die Bindung des Antikörperfragmentes an das Antigen Lewis Y auf MCF7-Zellen scheint jedoch durch die Kopplung an das Zytolysin E<sub>8</sub>C-LLO nicht beeinträchtigt zu werden (Abbildung 3.11 (C)). Aufgrund dieser Ergebnisse konnte eine Zelltyp-spezifische Toxizität des Immuntoxins B3-LLO erwartet werden.

### 3.1.9 Zytotoxizität des Immuntoxins B3-LLO

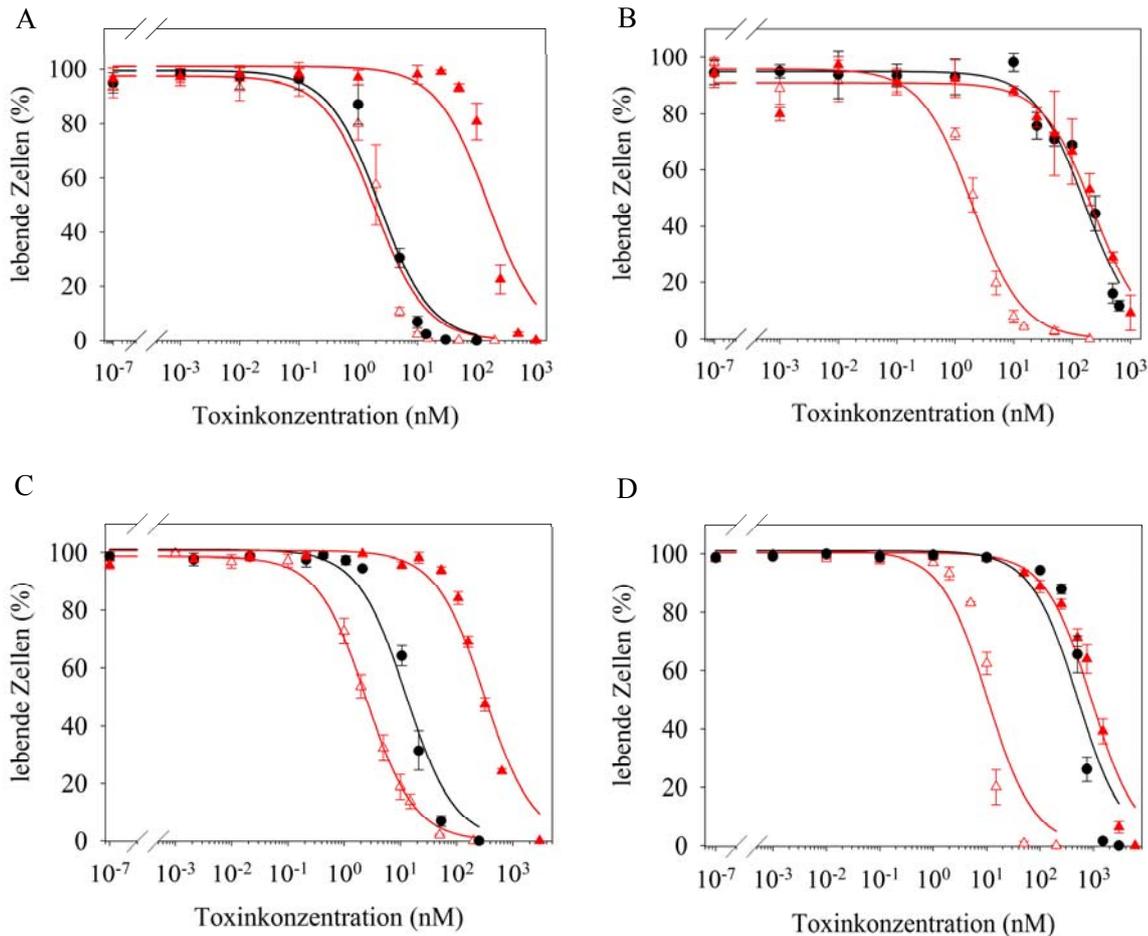
In den vorherigen Kapiteln konnte gezeigt werden, dass das Immuntoxin B3-LLO in Serum stabil ist und die Kopplung der beiden Proteine B3-R<sub>8</sub>CP und E<sub>8</sub>C-LLO vermutlich keinen Einfluss auf ihre biologische Aktivität besitzt. Im Folgenden wird die Spezifität und Effizienz des Immuntoxins, Lewis Y-positive Krebszellen zu töten, anhand von Antigen-positiven und -negativen Zelllinien untersucht. Als Vergleich diente dabei die Untersuchung der Zytotoxizität des isolierten E<sub>8</sub>C-LLO in oxidiertem (E<sub>8</sub>C-LLOox) und reduzierter (E<sub>8</sub>C-LLOred) Form.

Aus den Daten der Fluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie war bekannt, welche Zelllinien Lewis Y-positiv bzw. -negativ sind und sich somit als Positiv- bzw. Negativkontrollen eignen würden. Für die Analyse der Zytotoxizität wurden die Zellen, wie in Abschnitt 2.15.7.2 beschrieben, mit dem jeweiligen Toxin in verschiedenen Konzentrationen für 48 h bei 37 °C inkubiert. Für die Auswertung der Titrationsreihen wurden die Zellen wie beschrieben (2.15.7.2) mit Propidiumjodid gefärbt, und am Durchflusszytometer hinsichtlich ihrer Lebensfähigkeit analysiert. Für jede Toxinkonzentration konnte damit der prozentuale Anteil lebender bzw. toter Zellen bestimmt werden. Aus den gewonnenen Daten konnten die EC<sub>50</sub>-Werte des jeweiligen Toxins für die jeweilige Zelllinie bestimmt werden (2.15.7.4). In Abbildung 3.12 sind die Titrationskurven für die einzelnen Toxine sowie Zelllinien dargestellt. Das Immuntoxin B3-LLO war mit einem EC<sub>50</sub> von  $2.3 \pm 0.5$  nM für die Zelllinien MCF7 bzw. einem EC<sub>50</sub> von  $12.7 \pm 1.94$  nM für SKBR-3 sehr effizient in der Eliminierung der Lewis Y-positiven Krebszellen (Abbildung 3.12 (A) und (C) und Tabelle 3.3).

Tabelle 3.3: Übersicht über die aus den Zytotoxizitätsexperimenten ermittelten EC<sub>50</sub>-Werte für die verschiedenen Toxine und Zelllinien.

Toxin	EC <sub>50</sub> -Werte (nM)			
	MCF7 (Lewis Y <sup>+</sup> )	SKBR-3 (Lewis Y <sup>+</sup> )	HT-29 (Lewis Y <sup>-</sup> )	HeLa (Lewis Y <sup>-</sup> )
E <sub>8</sub> C-LLOred	$1.9 \pm 0.4$	$2.49 \pm 0.15$	$1.9 \pm 0.25$	$10.34 \pm 2.23$
B3-LLO	$2.3 \pm 0.5$	$12.7 \pm 1.94$	$168.9 \pm 38.9$	$503.78 \pm 164.11$
E <sub>8</sub> C-LLOox	$153.8 \pm 41$	$314.8 \pm 40.67$	$231.5 \pm 58.1$	$910.63 \pm 164.07$

Die etwas niedrigere Toxizität des B3-LLO für die SKBR-3-Zellen war zu erwarten, da aus den Daten der Durchflusszytometrie bekannt war, dass SKBR-3 weniger Lewis Y auf der Zelloberfläche exprimiert (siehe auch Tabelle 3.1). Im Gegensatz dazu konnte nur eine Zelltyp-unspezifische Toxizität für die Lewis Y-negativen HT-29- ( $EC_{50}$ -Wert von  $168.9 \pm 38.9$  nM) (Abbildung 3.12 (B) und Tabelle 3.3) und HeLa-Zellen ( $EC_{50}$ -Wert von  $503.78 \pm 164.11$  nM, Abbildung 3.12 (D) und Tabelle 3.3) bestimmt werden. Diese geringe Zytotoxizität liegt etwa in der gleichen Größenordnung wie die für das isolierte oxidierte Toxin  $E_8C$ -LLOox (Tabelle 3.3).



**Abbildung 3.12:** Zytotoxizität des Immuntoxins B3-LLO. Verschiedene Zelllinien wurden mit B3-LLO inkubiert, um die Spezifität und Wirksamkeit des Immuntoxins zu untersuchen. Als Positivkontrollen wurden die Zelllinien MCF7 und SKBR-3 verwendet, als Negativkontrollen HT-29 und HeLa. Die Zellen wurden für 48 h mit verschiedenen Toxinkonzentrationen inkubiert. Anschließend konnte der Anteil lebender Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt werden. Als Vergleich für die biologische Aktivität des B3-LLO wurden die Zellen außerdem mit den isolierten Toxinen, oxidiertem  $E_8C$ -LLO ( $E_8C$ -LLOox) und reduziertem  $E_8C$ -LLO ( $E_8C$ -LLOred), inkubiert. Aus den hier dargestellten Daten konnten die  $EC_{50}$ -Werte für das jeweilige Toxin und die jeweilige Zelllinie bestimmt werden. Sämtliche Messungen wurden dreifach ausgeführt. Die Linien repräsentieren die Anpassung an die experimentell gewonnenen Daten, die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung des Mittelwertes dar.

(A) MCF7-Zellen, die mit  $E_8C$ -LLOred ( $\Delta$ ), B3-LLO ( $\bullet$ ) und  $E_8C$ -LLOox ( $\blacktriangle$ ) inkubiert wurden. Mit den gleichen Proteinen wurden auch HT-29 (B), SKBR-3 (C) und HeLa (D) inkubiert.

Dennoch unterscheidet das Immuntoxin B3-LLO zwischen Lewis Y-positiven und -negativen Zelllinien, wohingegen die Toxizität des E<sub>8</sub>C-LLOox Zelltyp-unspezifisch ist. Die Reduktion der Thiolgruppe des singulären Cysteins des E<sub>8</sub>C-LLO führt zu einer signifikanten Erhöhung der Toxizität. Das reduzierte E<sub>8</sub>C-LLO (E<sub>8</sub>C-LLOred) zeigt für alle Zelllinien einen nahezu identischen EC<sub>50</sub>-Wert (Tabelle 3.3). Für MCF7 und SKBR-3 zeigt E<sub>8</sub>C-LLOred etwa die gleiche zytotoxische Aktivität wie das Immuntoxin B3-LLO, ist aber wiederum Zelltyp-unspezifisch. Es ist zu beachten, dass das oxidierte Immuntoxin B3-LLO im Prinzip die gleiche geringe zytotoxische Aktivität zeigen sollte wie E<sub>8</sub>C-LLOox. Dies ist für Antigen-negative Zellen auch tatsächlich der Fall. Bei Lewis Y-positiven Zellen zeigt B3-LLO hingegen eine sehr hohe Zytotoxizität. Es wäre also denkbar, dass das Immuntoxin nach der durch das Antikörperfragment vermittelten Bindung und anschließenden Aufnahme in Lewis Y-positive Zellen intrazellulär reduziert wird und dadurch seine ursprünglich inhibierte Aktivität zurückgewinnt. Nach der Aufnahme in Antigen-positive Zellen zeigt das Immuntoxin B3-LLO damit eine nahezu identische Aktivität im Vergleich mit der aktivsten Toxinspezies E<sub>8</sub>C-LLOred.

Die in diesem Abschnitt gezeigten Ergebnisse zeigen, dass das polyionische Immuntoxin B3-LLO durch das gekoppelte Antikörperfragment B3-R<sub>8</sub>CP Lewis Y-positive Zelllinien spezifisch erkennt und diese effizient tötet. Es konnte also durch die Kopplung eines tumorspezifischen Antikörperfragmentes an ein Toxin über polyionische Fusionspeptide ein biologisch aktives und sehr wirksames Immuntoxin hergestellt werden.

#### **3.1.10 Zusammenfassung**

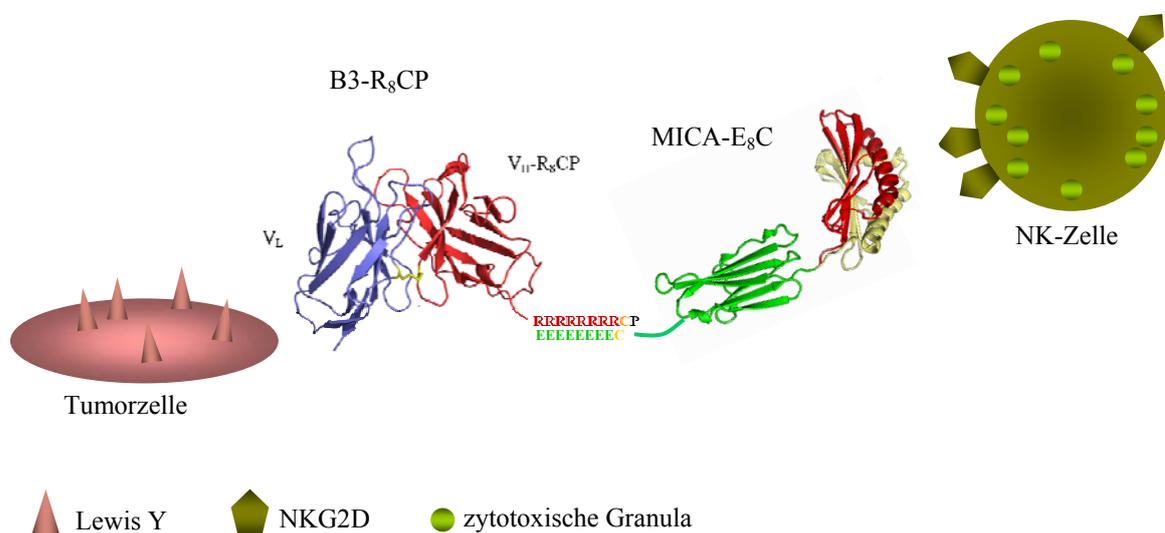
In diesem Kapitel wurde die Herstellung, Charakterisierung und biologische Aktivität des modularen Immunttoxins B3-LLO beschrieben. Zunächst erfolgte die Herstellung und Reinigung des tumorspezifischen Antikörperfragmentes B3-R<sub>8</sub>CP. Dessen biologische Aktivität, also die Bindung an Lewis Y-positive Zellen, wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie analysiert. Auf diese Weise konnten für Zellkulturexperimente geeignete Antigen-positive und -negative Zelllinien ermittelt werden. Im nächsten Schritt wurde das polyionische bakterielle Toxin E<sub>8</sub>C-LLO hergestellt, gereinigt und hinsichtlich seiner biologischen Aktivität untersucht. Bei Listeriolysin O handelt es sich um ein Zytolysin, welches die Fähigkeit besitzt, an cholesterinhaltige Zellmembranen zu binden. Monomere des Proteins bilden dabei ringförmige Poren nach der Bindung an die Membran, was letztlich zur Zellyse führt. Der Nachweis der Aktivität des Proteins kann mit Hilfe von Hämolyseexperimenten erfolgen. In diesen Hämolyseexperimenten, bei der die Membran nativer Erythrozyten durch das Protein E<sub>8</sub>C-LLO zerstört wird, zeigte sich, dass die polyionische LLO-Variante ebenso aktiv war wie LLO. Damit hat das N-terminale polyionische Fusionspeptid E<sub>8</sub>C keinen Einfluss auf die biologische Aktivität des Proteins. Das polyionische Antikörperfragment und das polyionische Toxin konnten aufgrund der entgegengesetzt geladenen Fusionspeptide über elektrostatische Wechselwirkungen miteinander interagieren. Durch die zusätzlich in die Fusionspeptide eingefügten Cysteine konnte sich unter den gegebenen Bedingungen eine Disulfidbrücke ausbilden, woraus ein kovalent verknüpftes bifunktionelles Immuntoxin B3-LLO resultierte. Da LLO die Eigenschaft besitzt, an Zellen binden zu können, musste gewährleistet werden, dass das Immuntoxin B3-LLO nicht über LLO sondern über das Antikörperfragment spezifisch an Zellen bindet. Dies

konnte über fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nachgewiesen werden. Es schloss sich die Untersuchung der biologischen Aktivität des bifunktionellen modularen Immuntoxins B3-LLO in Zellkulturexperimenten an. Dabei wurden verschiedene Antigen-positive und -negative Zelllinien mit B3-LLO inkubiert. Zum Vergleich der Aktivität wurden die Zellen außerdem mit den isolierten Toxinen, oxidiertem und reduziertem E<sub>8</sub>C-LLO, inkubiert. Die Oxidation der Thiolgruppe des singulären Cysteins des E<sub>8</sub>C-LLO führt dabei zu einem Verlust an lytischer Aktivität. Durch die Kopplung des B3-R<sub>8</sub>CP an E<sub>8</sub>C-LLO konnte ein Zelltyp-spezifisches, biologisch aktives und sehr wirksames Immuntoxin hergestellt werden.

## 3.2 Das Immunkonjugat B3-MICA

In den nachfolgenden Kapiteln wird die Herstellung der Proteine MICA und MICA-E<sub>8</sub>C beschrieben, deren vergleichende biophysikalische Charakterisierung, die Herstellung des modularen Immunkonjugates B3-MICA und dessen funktionelle Charakterisierung bzw. Untersuchung der biologischen Aktivität in Zellkultur.

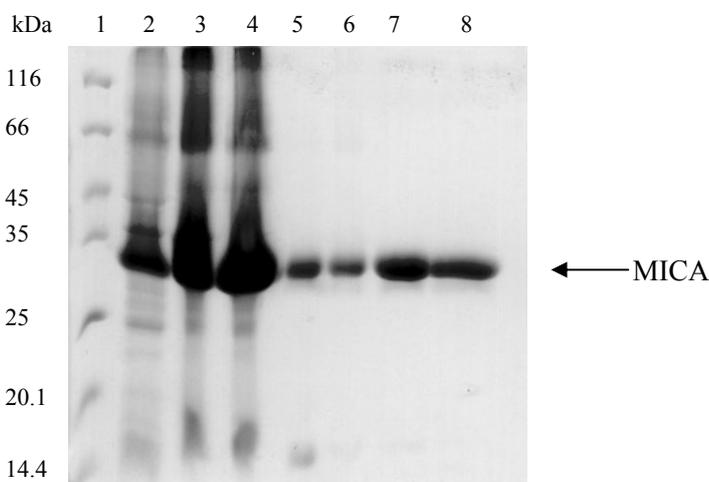
Das Konjugat, bestehend aus dem Antikörperfragment B3-R<sub>8</sub>CP und dem Immunliganden MICA-E<sub>8</sub>C, sollte wie unter 3.1 beschrieben mittels polyionischer Fusionspeptide durch kovalente Kopplung der Proteine hergestellt werden. Bei der funktionellen Untersuchung des Konstruktes in der Zellkultur sollte B3-R<sub>8</sub>CP als zellbindende Komponente fungieren und eine spezifische Bindung des bifunktionellen Konjugates an Tumorzellen vermitteln. Der Immunligand MICA-E<sub>8</sub>C sollte als Bindungspartner für den Rezeptor NKG2D auf Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) dienen. Eine Bindung des Liganden an den Rezeptor sollte dabei sowohl zur Aktivierung der NK-Zellen als auch zur Rekrutierung der NK-Zellen zu den Tumorzellen führen. Sowohl die Aktivierung der NK-Zellen als auch die Rekrutierung zu den Tumorzellen sollte letztlich mit der Eliminierung der Krebszellen einhergehen. Ein vergleichbares Konzept wurde bereits erfolgreich erprobt (von Strandmann *et al.*, 2006). Dabei wurde ein tumorspezifisches Antikörperfragment genetisch mit einem NKG2D-bindenden Liganden (ULBP2) fusioniert und für die Rekrutierung von NK-Zellen zur Eliminierung von Tumorzellen eingesetzt.



**Abbildung 3.13:** Schematische Darstellung des modularen Immunkonjugates B3-MICA, bestehend aus dem Antikörperfragment B3-R<sub>8</sub>CP und dem Immunliganden MICA-E<sub>8</sub>C, welches simultan an Tumor- und NK-Zellen bindet. Für die Darstellung des bifunktionellen Konstruktes wurde die Kristallstruktur des B3-R<sub>8</sub>CP-homologen Proteins dsFv-B1 (PDB:1DSF, Almog *et al.*, 1998) und die Kristallstruktur des rezeptor-gebundenen MICA (PDB:1HYR, Li *et al.*, 2001) verwendet. Schematisch dargestellt sind außerdem die Bindung des Antikörperfragmentes an das Antigen Lewis Y auf Tumorzellen sowie die simultane Bindung des MICA-E<sub>8</sub>C an den NKG2D-Rezeptor auf NK-Zellen.

### 3.2.1 Herstellung und Reinigung von MICA

Die Expression des Proteins MICA erfolgte mit C-terminalem His<sub>6</sub>-tag als *inclusion bodies* in *E. coli*. Nach dem Zellaufschluss (2.13.3.2) mit 30 g Biofeuchtmasse (*E. coli* BL21-CodonPlus<sup>®</sup> (DE3)-RIL (pET22b-MICA)) und der sich anschließenden *inclusion bodies*-Präparation (nach Rudolph *et al.*, 1997) konnten 4.3 g *inclusion bodies* erhalten werden. 2 g der *inclusion bodies* wurden solubilisiert (2.13.3.3) und wie beschrieben (2.13.3.5) renaturiert. Dabei wurde ein Teil der *inclusion bodies* nach Steinle *et al.* (2001) und ein Teil nach einem modifizierten Protokoll von Stubenrauch *et al.* (2001) renaturiert. Da die Ausbeute bei der zweiten Methode höher war als bei der Ersten und der analytische Vergleich der Proteine nach der Rückfaltung mittels *reversed phase* Chromatographie keine Unterschiede zeigte, wurden MICA und die polyionische Variante MICA-E<sub>8</sub>C modifiziert nach Stubenrauch *et al.* (2001) renaturiert. Nach Renaturierung, Ultrafiltration und Dialyse der Proteinlösung erfolgte die weitere Konzentrierung und die Reinigung des Proteins mittels Ni-NTA HisTrap<sup>™</sup>-Säule. Das gebundene MICA wurde dabei in einem Säulenvolumen eluiert (2.13.3.10). Das Protein wurde abschließend mittels Größenausschlusschromatographie gereinigt, um falsch gefaltetes Protein und Aggregate, welche im Ausschlussvolumen der Säule eluieren, zu separieren. Auf diese Weise konnten nach der Renaturierung und Reinigung aus 114.2 mg solubilierten *inclusion bodies* MICA 15.3 mg gereinigtes Protein erhalten werden. Eine Zusammenfassung der *inclusion bodies*-Präparation und Reinigung des Proteins MICA findet sich in Abbildung 3.14.

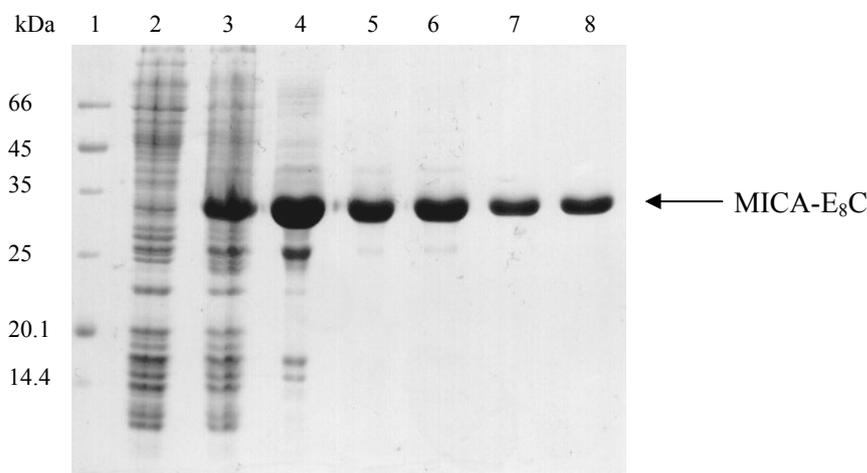


**Abbildung 3.14:** 15 %-iges SDS-Gel nach Coomassie-Färbung zur Analyse der *inclusion bodies*-Präparation und Reinigung von MICA. Sämtliche Proben wurden mit nicht reduzierendem SDS-Probenpuffer versetzt.

(1) Marker; (2) Rohextrakt nach dem Zellaufschluss; (3) *inclusion bodies* nach dem ersten Waschschrift der *inclusion bodies*-Präparation; (4) *inclusion bodies* nach dem vierten Waschschrift der *inclusion bodies*-Präparation; (5,6) renaturiertes MICA nach der Elution von der Ni-NTA HisTrap-Säule mit 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 500 mM Imidazol, pH 8.0; (7,8) MICA nach dem letzten Reinigungsschritt mittels Größenausschlusschromatographie.

### 3.2.2 Expression und Reinigung von MICA-E<sub>8</sub>C

Um eine Kopplung des MICA über ein polyionisches Fusionspeptid an das Antikörperfragment B3-R<sub>8</sub>CP zur Herstellung des bifunktionellen Konstruktes B3-MICA zu ermöglichen, wurde der C-terminale His<sub>6</sub>-tag des MICA durch die Aminosäuren GSCE<sub>8</sub>P ersetzt. Bei der so entstandenen polyionischen MICA-Variante MICA-E<sub>8</sub>C befindet sich vor dem Cystein und den 8 Glutamaten ein Glycin-Serin-linker, der eine ausreichende Flexibilität der polyionischen Fusion gewährleistet. Eine Expression in *E. coli* im analytischen Maßstab zeigte, dass 3 h nach Induktion mit 1 mM IPTG das Maximum der Proteinexpression erreicht war. MICA-E<sub>8</sub>C wurde, wie MICA, ebenfalls unlöslich als *inclusion bodies* exprimiert. Die Präparation von MICA erfolgte nach dem Zellaufschluss wie unter 2.13.3.2 beschrieben mit 29 g Biofeuchtmasse (*E. coli* BL21-CodonPlus<sup>®</sup> (DE3)-RIL (pET22b-MICA-E<sub>8</sub>C)). Nach der *inclusion bodies*-Präparation (nach Rudolph *et al.*, 1997) konnten 2.7 mg *inclusion bodies* MICA-E<sub>8</sub>C erhalten werden. Diese wurden solubilisiert (2.13.3.3) und wie beschrieben renaturiert (2.13.3.5). Nach der Renaturierung wurde die Proteinlösung mittels Ultrafiltration aufkonzentriert und anschließend dialysiert. Daran schloss sich der erste Reinigungsschritt mittels Anionenaustauschchromatographie an. MICA-E<sub>8</sub>C eluierte von der Säule bei ca. 380 mM NaCl. Nach einem Konzentrierungsschritt, bei dem das MICA-E<sub>8</sub>C erneut auf die Säule aufgetragen und in einem Säulenvolumen eluiert wurde, erfolgte die abschließende Reinigung mittels Größenausschlusschromatographie. Aus 200 mg solubilisierten *inclusion bodies* MICA-E<sub>8</sub>C konnten nach der Renaturierung und Reinigung 33.4 mg Protein erhalten werden. Eine Übersicht über die Expression und Reinigung von MICA-E<sub>8</sub>C gibt Abbildung 3.15.



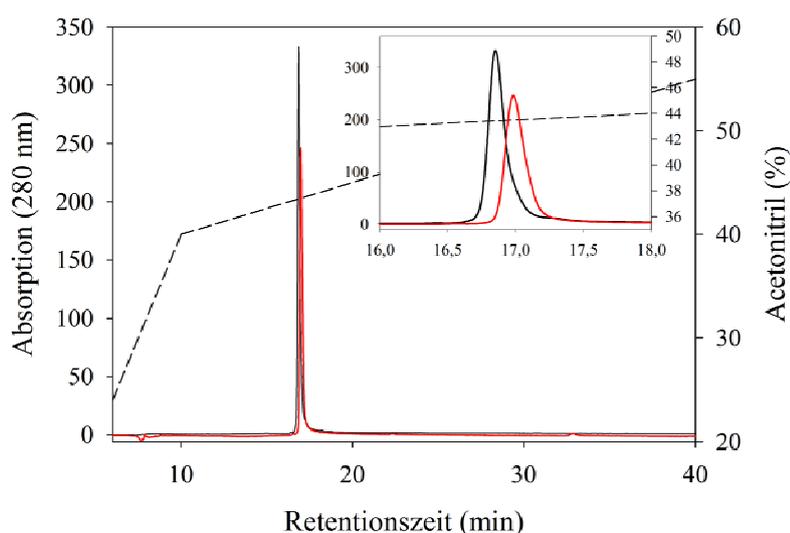
**Abbildung 3.15:** Das 15 %-ige Coomassie gefärbte SDS-Gel dokumentiert die Expression und Reinigung von MICA-E<sub>8</sub>C. Sämtliche Proben wurden mit nicht reduzierendem SDS-Probenpuffer versetzt.

(1) Marker; (2) unlösliche Fraktion des Zellysates vor Induktion der Proteinexpression; (3) unlösliche Fraktion des Zellysates 2 h nach Induktion der Proteinexpression; (4) *inclusion bodies* nach dem letzten Waschschrift der *inclusion bodies*-Präparation; (5,6) renaturiertes MICA-E<sub>8</sub>C nach der Elution von der HiTrap Q HP-Säule durch einen linearen Gradienten mit ansteigender Ionenstärke; (7,8) MICA-E<sub>8</sub>C nach der Größenausschlusschromatographie

### 3.2.3 Charakterisierung der MICA-Varianten

#### 3.2.3.1 HPLC-Analyse der Proteine

Sowohl MICA als auch die polyionische Variante MICA-E<sub>8</sub>C wurden hinsichtlich der Homogenität der Proteinpräparation mittels *reversed phase* Chromatographie analysiert (vgl. 2.13.3.7). MICA-E<sub>8</sub>C besitzt 8 Cysteine, wobei 6 Cysteine 3 Disulfidbrücken ausbilden. Eines der beiden freien Cysteine ist im C-terminalen Bereich des Proteins lokalisiert, das andere Cystein in der polyionischen E<sub>8</sub>C-Fusion. Aufgrund der leicht oxidierenden Bedingungen während der Renaturierung des Proteins wurde davon ausgegangen, dass die beiden freien Cysteine mit GSSG (oxidiertes Glutathion) modifiziert wurden. Um eine homogene Disulfidverbrückung und damit die Homogenität der Proteinlösung nachzuweisen, wurden MICA-E<sub>8</sub>C und MICA über eine C<sub>4</sub>-Säule an einer HPLC-Anlage analysiert. Das Chromatogramm mit dem Elutionspeak lässt dabei Rückschlüsse auf die Homogenität der Proteinpräparation zu. Ebenso lässt sich die Reinheit des Proteins verifizieren. In Abbildung 3.16 sind die Elutionsprofile der beiden Proteine gezeigt.



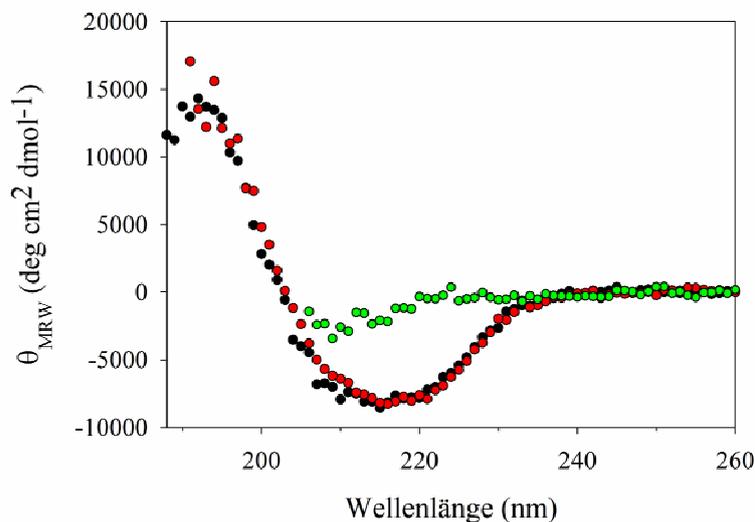
**Abbildung 3.16:** Analyse der MICA-Varianten MICA (—) und MICA-E<sub>8</sub>C (—) durch *reversed phase* Chromatographie an einer C<sub>4</sub>-Säule. Dargestellt sind die Chromatogramme der Elution der Proteine durch einen linear steigenden Gradienten an Acetonitril (0-100 %). Es ist die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm gezeigt. Die verkleinerte Abbildung zeigt die Vergrößerung der Elutionsprofile der beiden Proteine mit einer Retentionszeit zwischen 16 und 18 min.

Die Elutionsprofile zeigen jeweils einen scharfen Peak und somit keine Verunreinigungen durch andere Proteine bzw. MICA-Spezies. Die Elutionspeaks lassen außerdem vermuten, dass es sich bei beiden Proteinen um homogen disulfidverbrückte Spezies handelt. Bei teilweiser falscher Disulfidverbrückung würde man keinen scharfen Peak sondern mehrere Peaks bzw. einen Peak mit mehreren Maxima erwarten. Die Differenzen in der Retentionszeit zwischen MICA und MICA-E<sub>8</sub>C lassen sich vermutlich auf die polyionische Fusion zurückführen. Die Elutionsfraktionen von MICA und MICA-E<sub>8</sub>C wurden aufgefangen und massenspektrometrisch analysiert. Die Massenspektren lieferten das Ergebnis, dass sämtliche freien Cysteine beider Proteine mit GSSG modifiziert waren.

Damit liegen beide Proteine sehr wahrscheinlich als homogen disulfidverbrückte Proteinlösungen vor. Die Identität des MICA-E<sub>8</sub>C wurde zusätzlich durch N-terminale Sequenzierung bestätigt. Diese wurde freundlicherweise von Dr. Ines Neundorf (Universität Leipzig) durchgeführt.

### 3.2.3.2 CD-spektroskopische Untersuchungen der MICA-Varianten

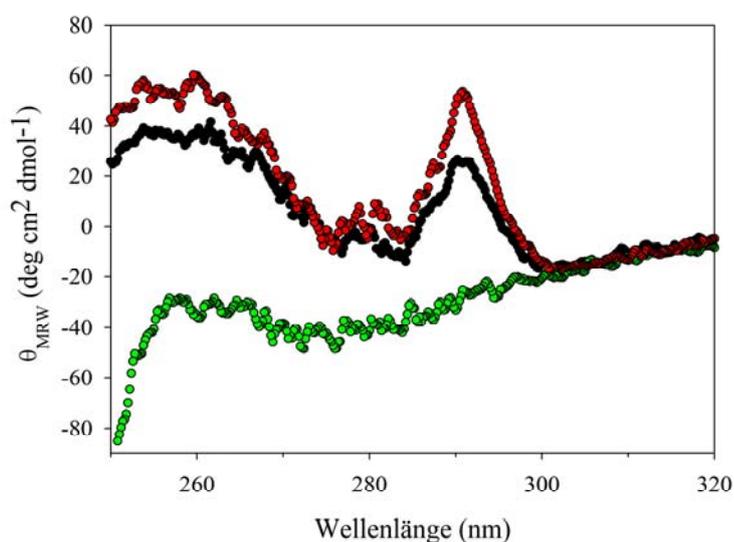
Mit Hilfe der CD-Spektroskopie kann untersucht werden, ob das angefügte polyionische Fusionspeptid einen Einfluss auf die Struktur von MICA hat. Zudem können die Protein-Varianten hinsichtlich ihres Sekundärstrukturgehaltes untereinander verglichen werden. Laut CD-Spektren enthalten die Proteine (Abbildung 3.17) einen hohen Anteil an  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen, was in guter Übereinstimmung mit der Röntgenkristallstruktur des MICA steht (Li *et al.*, 1999; 2001).



**Abbildung 3.17:** Fern-UV-CD-Spektren von MICA (●), MICA-E<sub>8</sub>C (●) und in 6 M Guanidiniumhydrochlorid denaturiertem MICA-E<sub>8</sub>C (●). MICA und MICA-E<sub>8</sub>C waren in 25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 50 mM NaCl, pH 7.4 gelöst. Die Spektren wurden bei 20 °C in einer Quarzglasküvette mit 0.1 mm Schichtdicke aufgenommen.

Die Spektren von MICA und MICA-E<sub>8</sub>C unterscheiden sich nicht. Man kann also davon ausgehen, dass beide Proteine gleich strukturiert sind. Zudem wird deutlich, dass die polyionische Fusion E<sub>8</sub>C vermutlich keinen Einfluss auf die Struktur des MICA hat.

Eine weitere Analysemethode ist die Aufnahme von Nah-UV-CD-Spektren, welche eine Information über die Umgebung aromatischer Aminosäuren und damit indirekt über die native Struktur von Proteinen liefern. Es wurden vergleichend Spektren von MICA, MICA-E<sub>8</sub>C und von Hitze-denaturiertem (bei 90 °C) MICA-E<sub>8</sub>C aufgenommen (Abbildung 3.18).



**Abbildung 3.18:** Nah-UV-CD-Spektren von MICA (●), MICA-E<sub>8</sub>C (●) und bei 90 °C denaturiertem MICA-E<sub>8</sub>C (●). Die Proteine waren in 25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, pH 7.4 gelöst. Die Spektren wurden bei 20 °C bzw. 90 °C in einer Quarzglas-küvette mit 1 cm Schichtdicke aufgenommen.

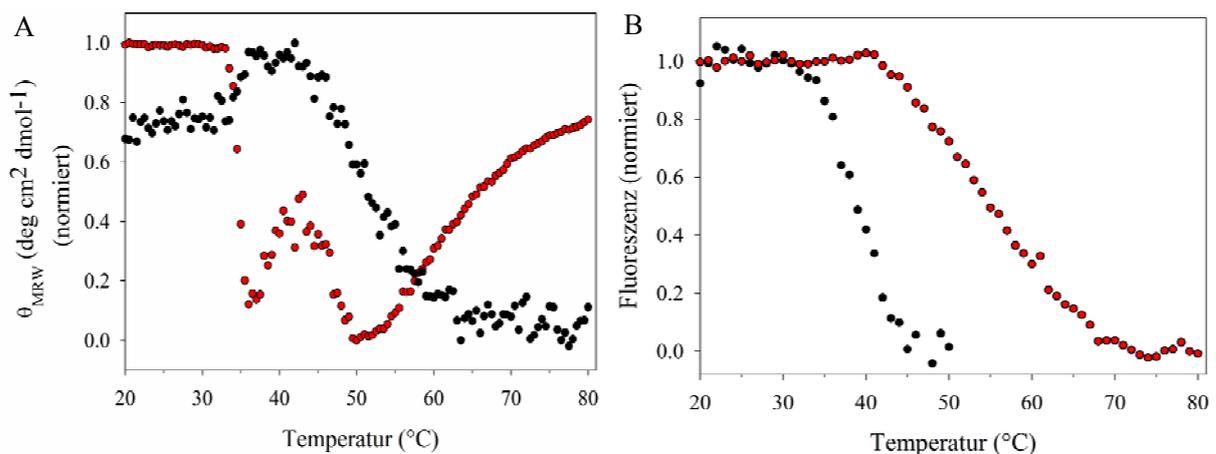
Die Spektren von MICA und MICA-E<sub>8</sub>C weisen, auch im Vergleich mit dem Spektrum des denaturierten MICA-E<sub>8</sub>C, auf strukturiertes Protein hin. Die Spektren von MICA und MICA-E<sub>8</sub>C zeigen einen sehr ähnlichen Verlauf, sind jedoch nicht völlig identisch. Bei einer Wellenlänge von 290 nm zeigen beide Spektren ein Signal, welches auf die in den Proteinen befindlichen Tryptophane zurückzuführen ist. Dieses Signal verschwindet bei der denaturierten Variante MICA-E<sub>8</sub>C, da die Tryptophane hier in einer anderen, lösungsmittel-exponierten Umgebung vorliegen. In beiden MICA-Varianten liegen die aromatischen Aminosäuren offensichtlich in einer klar strukturierten Umgebung vor. Die leichten spektralen Unterschiede von MICA und MICA-E<sub>8</sub>C resultieren möglicherweise aus der, durch die polyionische Fusion bedingten, veränderten elektrostatischen Oberfläche.

### 3.2.3.3 Thermische Stabilität der MICA-Varianten

Die Analyse der thermischen Stabilität der Proteine MICA und MICA-E<sub>8</sub>C erfolgte sowohl mittels CD-Spektroskopie als auch Fluoreszenzspektroskopie. Die Nah-UV-CD-Spektren von MICA und MICA-E<sub>8</sub>C (Abbildung 3.18) zeigen im Vergleich zum denaturierten Spektrum von MICA-E<sub>8</sub>C eine große Signaldifferenz im Bereich von 290 nm, welche auf die in den Proteinen befindlichen Tryptophane zurückzuführen ist. Aus diesem Grund wurde das CD-Signal während der thermischen Denaturierung der Proteine bei 291 nm verfolgt. Die Analyse der thermisch induzierten Entfaltung der Proteine kann jedoch auch mittels Fluoreszenzspektroskopie erfolgen. Bei der Entfaltung ändert sich temperaturabhängig die Umgebung der aromatischen Aminosäuren und damit auch deren Fluoreszenz, welche am Fluoreszenzspektrometer detektiert werden kann. Die Analyse der thermischen Stabilität der Proteine ist in Abbildung 3.19 dargestellt.

In Abbildung 3.19 (A) sind die mittels CD-Spektroskopie ermittelten thermisch induzierten Übergänge der Proteine MICA und MICA-E<sub>8</sub>C dargestellt. Während das Protein MICA bei einer Temperatur von 80 °C vollständig aggregiert vorliegt, befindet sich MICA-E<sub>8</sub>C noch in Lösung. Diese erhöhte Löslichkeit kann auf die zusätzlichen Ladungen am Protein durch die polyionische Fusion E<sub>8</sub>C zurückgeführt werden. Dennoch zeigen beide Proteine eine relativ geringe Stabilität gegenüber thermisch induzierter Denaturierung. Bei beiden Proteinen können Änderungen im Signal und damit

Änderungen in der Struktur ab einer Temperatur von ca. 33 °C beobachtet werden. Ab ca. 50 °C steigt das Signal bei MICA wieder an, was auf die beginnende Aggregation des Proteins hindeutet. Dies konnte über Streulichtmessungen bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Unklar ist jedoch, zu welcher Art struktureller Änderung es bei MICA-E<sub>8</sub>C im Temperaturbereich um 33 °C kommt. Es wäre denkbar, dass sich der C-terminale Bereich, an den die polyionische Fusion angefügt ist, strukturell ändert und somit der Bereich der Rezeptorbindung vorerst unbeeinflusst bleibt und erst später entfaltet. Eine Aggregation des Proteins konnte hier, wie bereits erwähnt, nach Abschluss der Messung nicht beobachtet werden.



**Abbildung 3.19:** Stabilität des MICA und MICA-E<sub>8</sub>C gegenüber Temperatur. Die Analyse der thermisch induzierten Entfaltung der Proteine erfolgte durch Messung der Elliptizität am CD-Spektrometer bei einer Wellenlänge von 291 nm (A) und durch Messung der Fluoreszenzemission der Proteine bei einer Wellenlänge von 350 nm für MICA bzw. 352 nm für MICA-E<sub>8</sub>C (Anregungswellenlänge jeweils 295 nm) (B). Die Messung am CD-Spektrometer erfolgte bei einer Proteinkonzentration von 0,9 mg/mL für MICA bzw. 1 mg/mL für MICA-E<sub>8</sub>C in 25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, pH 7,4. Die Messung bei einer konstanten Heizrate von ca. 1 °C/min. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte bei einer Proteinkonzentration von je 50 µg/mL in 25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 100 mM NaCl, pH 7,4 bei einer konstanten Heizrate von ca. 1 °C/min.

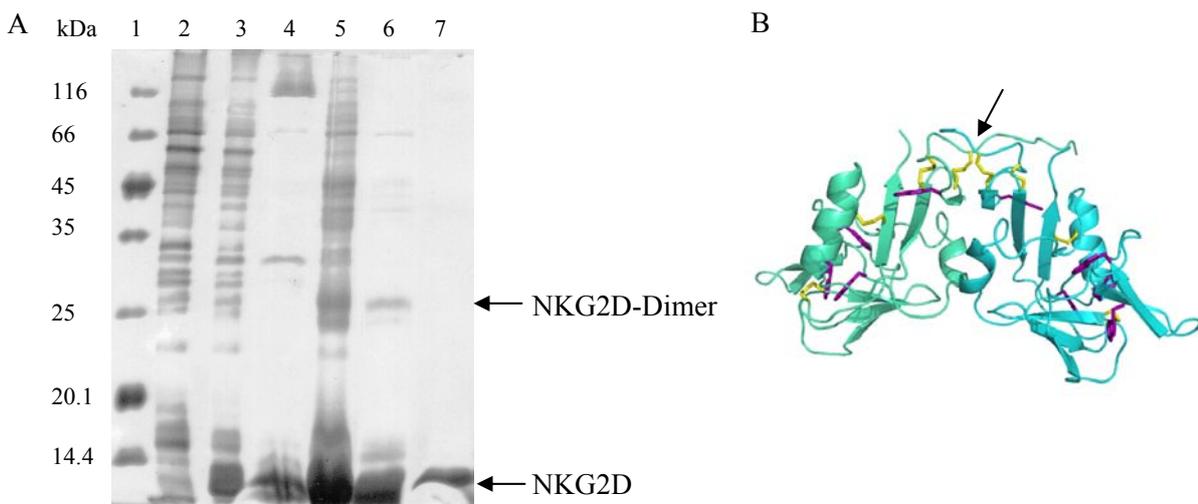
(A) Normierte mittlere residuale Elliptizität der Proteine MICA (●) und MICA-E<sub>8</sub>C (●) in Abhängigkeit von der Temperatur.

(B) Normiertes Fluoreszenzsignal der Proteine MICA (●) und MICA-E<sub>8</sub>C (●) in Abhängigkeit von der Temperatur.

Die durch CD-Spektroskopie erhaltenen Daten lassen sich weitestgehend durch die fluoreszenzspektroskopischen Daten (Abbildung 3.19 (B)) bestätigen. Auch hier kommt es bei MICA-E<sub>8</sub>C ab einer Temperatur von ca. 33 °C zur Abnahme des Fluoreszenzsignals und damit zu einer strukturellen Änderung des Proteins. Bei MICA hingegen nimmt das Fluoreszenzsignal, im Gegensatz zur CD-Spektroskopie, erst ab ca. 42 °C ab. Dies kann damit erklärt werden, dass bei der Fluoreszenzmessung eine Proteinkonzentration von 50 µg/mL verwendet wurde, wohingegen bei der CD-Spektroskopie für MICA mit einer Konzentration von 0,9 mg/mL gemessen wurde. Da Aggregation ein konzentrationsabhängiger Prozess ist, ist damit das Einsetzen der Aggregation bei höheren Temperaturen und der niedrigeren Proteinkonzentration zu erklären. Insgesamt weisen beide Proteine eine relativ geringe Stabilität gegenüber thermisch induzierter Denaturierung auf.

### 3.2.4 Herstellung und Reinigung von NKG2D

In diesem Abschnitt wird die Herstellung und Reinigung der extrazellulären Domäne des NK-Zell-Rezeptors NKG2D beschrieben. Bei dieser Domäne handelt es sich um den Bindungspartner von MICA. Das renaturierte gereinigte Rezeptorfragment sollte in Bindungsstudien mit MICA-E<sub>8</sub>C zum Einsatz kommen. Die extrazelluläre Domäne von NKG2D wurde unlöslich als *inclusion bodies* in *E. coli* exprimiert. Der Zellaufschluss erfolgte mit 30.5 g Biofeuchtmasse (*E. coli* BL21-CodonPlus® (DE3)-RIL pET22b-NKG2D)). Anschließend wurden die *inclusion bodies* präpariert (2.13.3.2, nach Rudolph *et al.*, 1997) und solubilisiert (2.13.3.3). Aus 30.5 g Biomasse konnten 2.2 g *inclusion bodies* gewonnen werden. Die Rückfaltung des Rezeptors erfolgte wie beschrieben (2.13.3.6) modifiziert nach Steinle *et al.* (2001). Im Anschluss an die Renaturierung wurde die Proteinlösung mit Hilfe von Amicon-Zentrifugalkonzentratoren aufkonzentriert. Die Reinigung des Proteins erfolgte mittels Größenausschlusschromatographie. Einen Überblick über die Expression, Renaturierung und Reinigung gibt Abbildung 3.20. Aus 49 mg solubilisierten *inclusion bodies* NKG2D konnten 160 µg Protein gereinigt werden. Diese relativ geringe Ausbeute lässt sich mit der starken Aggregationsneigung des Proteins und somit großen Verlusten während der Konzentrierung und Reinigung erklären.



**Abbildung 3.20:** Dargestellt sind ein 18 %-iges SDS-Gel nach Coomassie-Färbung zur Analyse der Expression und Reinigung der extrazellulären Domäne des Rezeptors NKG2D (A). Sämtliche Proben wurden mit nicht reduzierendem SDS-Probenpuffer versetzt. In (B) ist die Kristallstruktur des Rezeptors dargestellt. Der Pfeil markiert die zwei nahe aneinander liegenden Disulfidbrücken der jeweiligen Monomere.

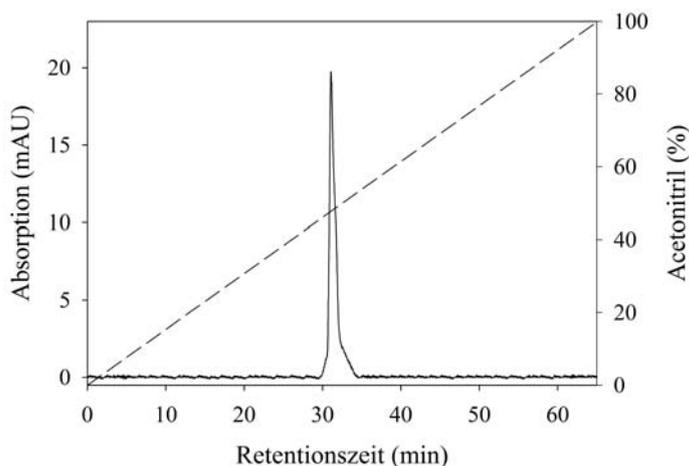
(A) (1) Marker; (2) unlösliche Fraktion des Zelllysates vor Induktion der Proteinexpression; (3) unlösliche Fraktion des Zelllysates 3 h nach Induktion der Proteinexpression; (4) *inclusion bodies* nach dem letzten Waschschritt der *inclusion bodies*-Präparation; (5) NKG2D nach Renaturierung und Aufkonzentrierung; (6) löslicher Anteil nach Dialyse und Zentrifugation, vor der Größenausschlusschromatographie; (7) gereinigtes Protein nach der Größenausschlusschromatographie.

(B) Kristallstruktur der extrazellulären Domäne des NK-Zell-Rezeptors NKG2D (PDB: 1HYR). Dargestellt ist das funktionelle Dimer des Rezeptors. Die Disulfidbrücken sind in gelb gezeigt. Die Tryptophane des Rezeptors sind in violett dargestellt. Zum Bereich der MICA-Bindung siehe Abbildung 1.10 (A).

In Spur 6 (Abbildung 3.20 (A)) ist eine Dimer-Bande des Proteins zu sehen, welche sich auch nach der Größenausschlusschromatographie in einigen Fraktionen wieder fand. Der NKG2D-Rezeptor sollte

sowohl unter reduzierenden als auch unter nicht reduzierenden Bedingungen im SDS-Gel als Monomer vorliegen. Die funktionelle Form des Rezeptors zur Bindung des MICA-E<sub>8</sub>C ist jedoch ein nicht-kovalent assoziiertes Dimer. Da die Gelproben in Abbildung 3.20 (A) unter nicht reduzierenden Bedingungen analysiert wurden, ist es wahrscheinlich, dass der Rezeptor teilweise kovalent disulfidverbrückt vorliegt. Vermutlich bilden dabei zwei nahe beieinander liegende Disulfidbrücken (Abbildung 3.20 (B), Pfeil) ein gemischtes Disulfid. Da dies nicht den Bereich der Ligandenbindung betrifft, hat die teilweise kovalente Verknüpfung der Rezeptor-Monomere vermutlich keinen Einfluss auf die Funktionalität des Rezeptors.

Die Homogenität der Proteinpräparation wurde mittels *reversed phase* Chromatographie analysiert (Abbildung 3.21). Der NKG2D-Rezeptor wurde anschließend auf seine Identität hin mittels Massenspektrometrie untersucht.



**Abbildung 3.21:** Analyse der extrazellulären Domäne des NKG2D-Rezeptors durch *reversed phase* Chromatographie an einer C<sub>18</sub>-Säule. Dargestellt ist das Chromatogramm der Elution des Proteins durch einen linear steigenden Gradienten an Acetonitril (0-100 %). Es ist die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm gezeigt.

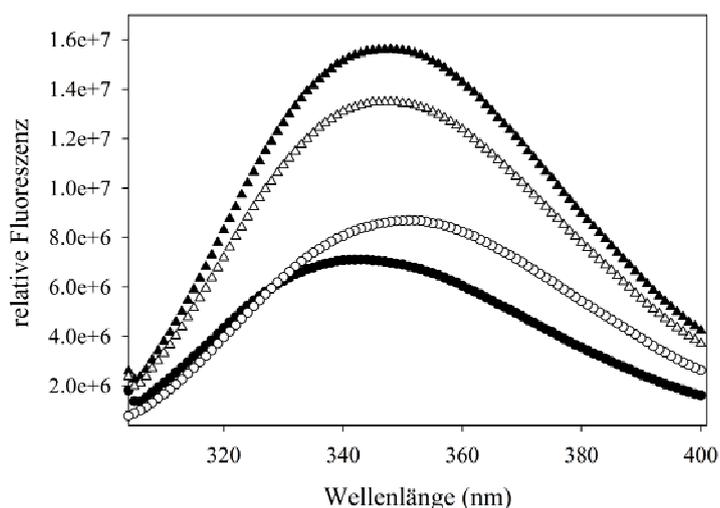
Bei der massenspektrometrischen Analyse stellte sich heraus, dass bei einem Teil des Proteins das N-terminale Start-Methionin abgespalten war. Dies könnte die leichte Inhomogenität des Elutionspeaks der *reversed phase*-HPLC erklären. Des Weiteren wäre es auch möglich, dass ein sehr geringer Teil des Proteins nicht korrekt disulfidverbrückt vorliegt. Dennoch handelt es sich um eine größtenteils homogene Proteinpräparation, die für Bindungsstudien genutzt werden kann.

### 3.2.5 Funktionalitätsstudien zu MICA-E<sub>8</sub>C

In diesem Abschnitt soll auf die unterschiedlichen Untersuchungsmethoden und Ergebnisse eingegangen werden, mit der die Funktionalität des MICA-E<sub>8</sub>C, also die Bindung an den Rezeptor NKG2D, nachgewiesen werden sollte. Die Bindung des Immunliganden MICA-E<sub>8</sub>C an den Rezeptor NKG2D ist für den späteren Einsatz des Konstruktes B3-MICA in Zellkulturexperimenten essenziell. Dabei soll MICA-E<sub>8</sub>C die Bindung an den Rezeptor auf NK-Zellen vermitteln, was zu einer Aktivierung und simultanen Rekrutierung der NK-Zellen zu Tumorzellen führen soll. Das Antikörperfragment B3-R<sub>8</sub>CP vermittelt dabei die Bindung an das Lewis Y-Antigen auf Tumorzellen. Durch die Lokalisation des polyionischen Fusionspeptides E<sub>8</sub>C am C-Terminus des MICA sollte die Bindung an den Rezeptor nicht beeinflusst werden.

#### 3.2.5.1 Fluoreszenzspektroskopische Untersuchung

Die Proteine MICA-E<sub>8</sub>C und NKG2D enthalten die fluoreszenzspektroskopisch aktiven Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin, so dass sich charakteristische Fluoreszenzspektren aufnehmen lassen. Neben den Einzelspektren der beiden Proteine wurde auch ein Spektrum eines Proteingemisches von MICA-E<sub>8</sub>C und NKG2D aufgenommen. Die beiden Proteine wurden hierbei äquimolar gemischt, da die Stöchiometrie der Bindung von MICA-E<sub>8</sub>C an den dimeren Rezeptor NKG2D 1:1 beträgt. Würde bei einer Bindung des MICA-E<sub>8</sub>C an den Rezeptor NKG2D eine Änderung der Umgebung einiger Aromaten erfolgen, so würde man eine Differenz im gemessenen Spektrum zu dem durch Addition der Einzelspektren erhaltenen Spektrum erwarten.

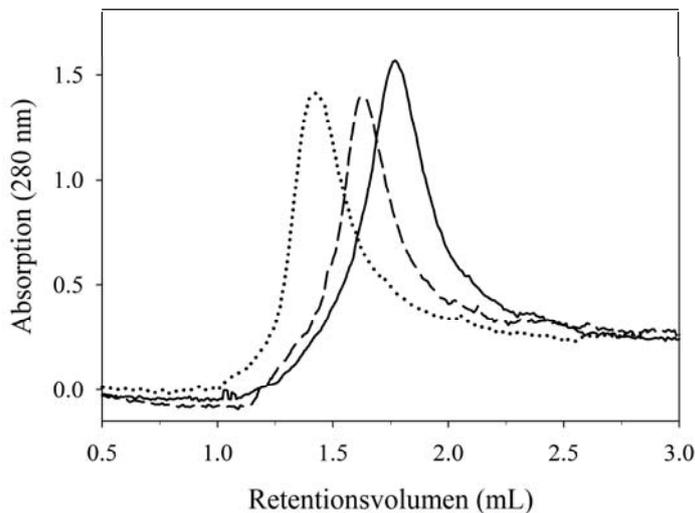


**Abbildung 3.22:** Fluoreszenzspektren der Proteine NKG2D (●), MICA-E<sub>8</sub>C (○) und des Proteingemisches aus NKG2D und MICA-E<sub>8</sub>C (▲). Das durch Addition der Einzelspektren von NKG2D und MICA-E<sub>8</sub>C erhaltene Spektrum ist ebenfalls dargestellt (▲). Die Messungen wurden bei einer Proteinkonzentration von 1.71  $\mu$ M in 25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 100 mM NaCl, pH 7.4 in einer Halbmikrofluoreszenzküvette durchgeführt. Die Anregung erfolgte bei 295 nm. Die Spektren wurden von 300 – 400 nm aufgenommen.

In Abbildung 3.22 ist deutlich zu erkennen, dass zwischen dem gemessenen Spektrum des Proteingemisches und dem durch Addition der Einzelspektren der Proteine erhaltenen Spektrum eine Differenz im Fluoreszenzsignal besteht. Dies deutet darauf hin, dass zwischen MICA-E<sub>8</sub>C und dem Rezeptor NKG2D eine Bindung stattfindet.

### 3.2.5.2 Analytische Gelfiltration

Bei einer Bindung des MICA-E<sub>8</sub>C an den Rezeptor NKG2D sollte der gebildete Proteinkomplex bei einem geringeren Retentionsvolumen von der Säule eluieren als die monomeren Proteine. Dies wurde mittels einer analytischen Gelfiltrationssäule (Superdex 75) untersucht (Abbildung 3.23).



**Abbildung 3.23:** Untersuchung der Komplexbildung zwischen NKG2D und MICA-E<sub>8</sub>C anhand einer analytischen Gelfiltrationssäule Superdex 75 (Säulenvolumen 3 mL). Als Laufpuffer diente 25 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.4. Die Proteine MICA-E<sub>8</sub>C und NKG2D wurden äquimolar (3 μM) gemischt, 2 h inkubiert bei Raumtemperatur, abzentrifugiert (13000 rpm) und analysiert. Es wurden jeweils 40 μL Probenvolumen auf die Säule aufgetragen. Gezeigt sind die Elutionsprofile des MICA-E<sub>8</sub>C-NKG2D-Komplexes (···) und der monomeren Komponenten MICA-E<sub>8</sub>C (---) bzw. NKG2D (—).

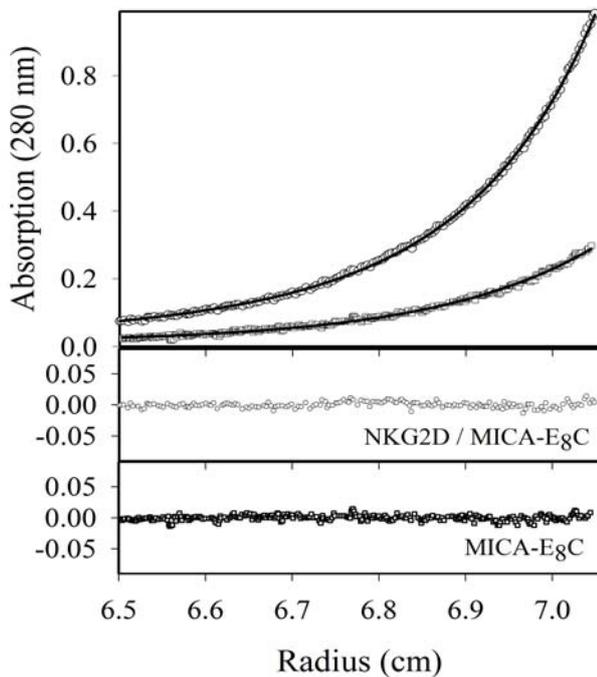
Die Elutionsprofile der einzelnen Proteine sowie des Komplexes lassen auf eine Bindung des MICA-E<sub>8</sub>C an den Rezeptor NKG2D schließen, da der Proteinkomplex bei einem geringeren Retentionsvolumen von der Säule eluiert als die Einzelkomponenten. MICA-E<sub>8</sub>C besitzt eine molekulare Masse von etwa 33 kDa und eluiert als Monomer. NKG2D liegt funktionell als nicht-kovalent assoziiertes Dimer vor und besitzt damit eine molekulare Masse von ca. 29 kDa. Die Proteine eluieren damit in einem ähnlichen Retentionsvolumen von der Säule. Der Komplex aus beiden Proteinen würde eine Masse von 62 kDa besitzen und damit in einem geringeren Volumen von der Säule eluieren als die einzelnen Proteine. Dies stimmt mit den Chromatogrammen der analytischen Gelfiltration gut überein. Die hier gewonnenen Daten stehen damit auch in guter Übereinstimmung mit den bekannten Daten zum Bindungs- und Elutionsverhalten von löslichem MICA und NKG2D (Steinle *et al.*, 2001).

### 3.2.5.3 Analytische Ultrazentrifugation

Eine weitere Methode, um die Komplexbildung zwischen MICA-E<sub>8</sub>C und NKG2D nachzuweisen, ist die analytische Ultrazentrifugation. Mit Hilfe von Sedimentations-Geschwindigkeitsläufen und Gleichgewichtsläufen kann die molekulare Masse von Proteinen bzw. Proteinkomplexen bestimmt werden. Die Untersuchung und Auswertung der experimentellen Daten erfolgte freundlicherweise durch Herrn PD Dr. Hauke Lilie wie unter 2.13.8 beschrieben.

In

Abbildung 3.24 sind die Gleichgewichtssedimentationsläufe von MICA-E<sub>8</sub>C und dem MICA-E<sub>8</sub>C-Rezeptor-Komplex gezeigt. Die experimentell bestimmten apparenten molekularen Massen stimmen relativ gut mit den theoretischen (29 kDa für NKG2D als funktionelles Dimer, 33 kDa für MICA-E<sub>8</sub>C, 62 kDa für den MICA-E<sub>8</sub>C-Rezeptor-Komplex) überein.



**Abbildung 3.24:** Gleichgewichtssedimentation des Komplexes aus MICA-E<sub>8</sub>C und NKG2D sowie des isolierten MICA-E<sub>8</sub>C. Die Messung erfolgte bei 12000 rpm, 20 °C. Für die Analyse der Komplexbildung wurden Proteinkonzentrationen von je 3,43 μM in 25 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4 verwendet. Aus den gezeigten Gleichgewichtssedimentationsläufen konnten apparente molekulare Massen von etwa 39 kDa für MICA-E<sub>8</sub>C (untere Kurve), 65 kDa für den Komplex (obere Kurve) und 29 kDa für den Rezeptor NKG2D (nicht gezeigt) bestimmt werden.

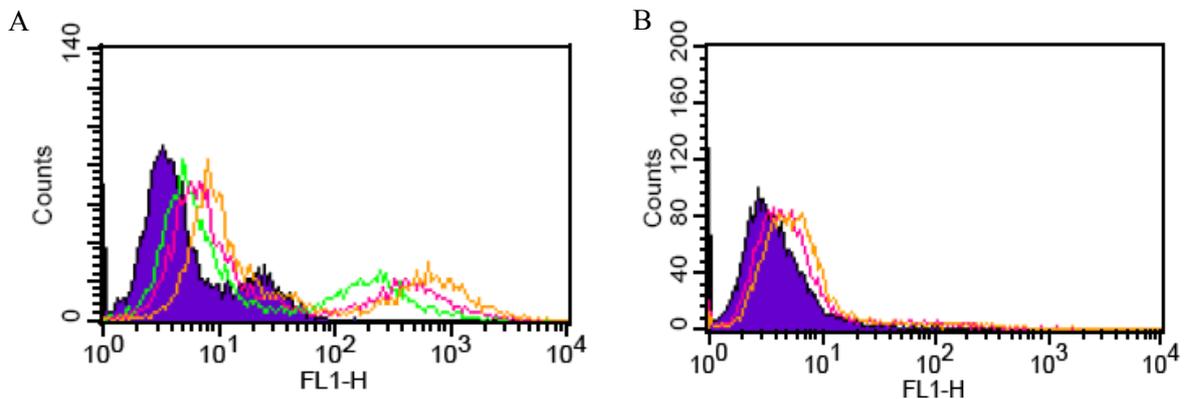
Die apparente molekulare Masse des Proteinkomplexes aus MICA-E<sub>8</sub>C und NKG2D von 65 kDa lässt auf eine tatsächliche Bindung der Proteine schließen. Somit konnte durch unterschiedliche Methoden unabhängig voneinander eine Bindung des Immunliganden MICA-E<sub>8</sub>C an den Rezeptor NKG2D *in vitro* nachgewiesen werden. Die *in vitro*-Bindung von rekombinant (durch Baculovirus-Expression) gewonnenem MICA an bakteriell exprimiertes und renaturiertes NKG2D konnte bereits durch Li *et al.* (2001) nachgewiesen werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass NKG2D-Homodimere stabile Komplexe mit monomerem MICA in Lösung bilden (Steinle *et al.*, 2001). Damit zeigen die hier gewonnenen Daten auch, dass die polyionische Fusion des MICA, wie erwartet, keinen Einfluss auf die Rezeptorbindung hat.

### 3.2.5.4 Bindung des MICA-E<sub>8</sub>C an NK-Zellen

Im Anschluss an den Nachweis der Komplexbildung von MICA-E<sub>8</sub>C und NKG2D *in vitro* sollte die Bindung des MICA-E<sub>8</sub>C an den NKG2D-Rezeptor auf NK-Zellen analysiert werden. Wie in einem späteren Abschnitt (3.2.10) gezeigt, präsentiert die Natürliche Killer-Zelllinie NK92 den NKG2D-Rezeptor an der Zelloberfläche. MICA-E<sub>8</sub>C wurde, wie unter 2.13.10 beschrieben, mit dem Thiolgruppen-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 C5-Maleimid markiert. Um eine Bindung des MICA-E<sub>8</sub>C nachzuweisen, wurden NK-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des fluoreszenzmarkierten Proteins inkubiert und dreimal mit PBS/3 % (v/v) FBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Analyse der Bindung am Durchflusszytometer (2.15.7.1). In Abbildung 3.25 (A) ist ein Histogramm der Messung gezeigt. Die Bindung des MICA-E<sub>8</sub>C an die NK-Zellen äußert sich dabei in der Verschiebung der gesamten Zellpopulation hin zu höheren Fluoreszenzintensitäten. An dieser Stelle sollte jedoch erwähnt werden, dass es sich bei den eingesetzten Protein-

konzentrationen um sehr hohe Konzentrationen handelt. Daher ist nicht auszuschließen, dass MICA-E<sub>8</sub>C zum Teil unspezifisch an die NK-Zellen bindet.

Um eine spezifische Bindung nachzuweisen, wurden die NKG2D-negativen Zellen SKBR-3 mit fluoreszenzmarkiertem MICA-E<sub>8</sub>C inkubiert und am Durchflusszytometer analysiert (Abbildung 3.25 (B)).



**Abbildung 3.25:** Durchflusszytometrische Analyse der MICA-E<sub>8</sub>C-Bindung an NK- und SKBR-3-Zellen. Dargestellt sind die Histogramme der Messung, bei denen die Anzahl der Zellen gegen die Fluoreszenzintensität von Kanal 1 aufgetragen sind.

(A) Gezeigt sind NK-Zellen, die mit Puffer (—) bzw. je 100 (—); 250 (—) und 500 µg/mL (—) fluoreszenzmarkiertem MICA-E<sub>8</sub>C inkubiert wurden. Bei der zweiten Population im Histogramm (neben der Hauptpopulation) handelt es sich vermutlich um tote bzw. nicht mehr vollkommen vitale Zellen. Dies könnte eine parallel durchgeführte Färbung mit Propidiumjodid zeigen.

(B) Gezeigt sind SKBR-3-Zellen, die NKG2D-negativ sind. Die Zellen wurden mit Puffer (—) bzw. je 250 (—) und 500 µg/mL (—) fluoreszenzmarkiertem MICA-E<sub>8</sub>C inkubiert.

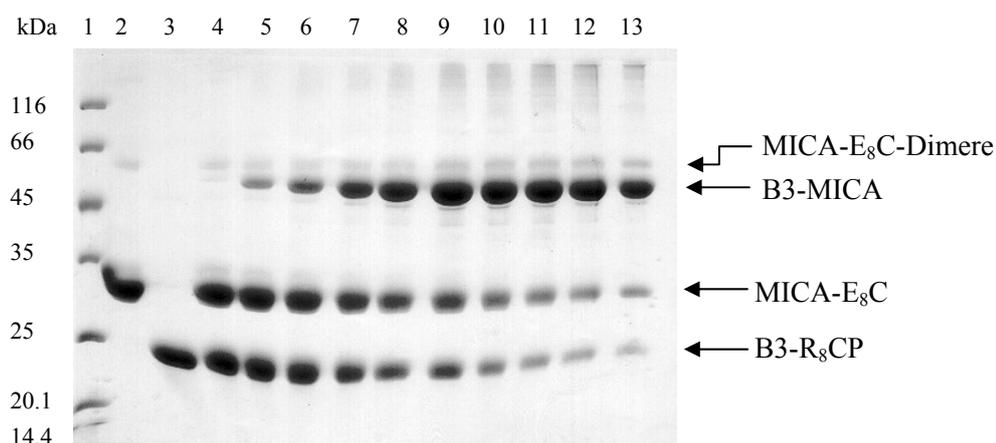
Es zeigte sich dabei, dass MICA-E<sub>8</sub>C zwar an die Zellen bindet, die Histogramme jedoch nicht so eine starke Fluoreszenzverschiebung aufweisen wie diejenigen für die NK-Zellen bei gleichen Proteinkonzentrationen. Dies bedeutet, dass sowohl an die NK-Zellen als auch an die SKBR-3-Zellen ein gewisser Teil MICA-E<sub>8</sub>C unspezifisch bindet. Um jedoch eine spezifische Interaktion von MICA-E<sub>8</sub>C mit dem NKG2D-Rezeptor auf NK-Zellen nachzuweisen, wurden weitere Experimente durchgeführt. Dabei kamen unterschiedliche Konkurrenzexperimente zum Einsatz. Es wurde versucht, das Rezeptor-gebundene fluoreszenzmarkierte MICA-E<sub>8</sub>C mit unmarkiertem Protein zu konkurrieren (Daten nicht gezeigt). Weiterhin wurden verschiedene Studien durchgeführt, bei denen NK-Zellen mit einem anti-NKG2D-Antikörper vorinkubiert wurden, um die Bindung des MICA-E<sub>8</sub>C an den Rezeptor zu blockieren. Anschließend wurden die so behandelten Zellen mit MICA-E<sub>8</sub>C inkubiert, wobei dennoch eine Bindung nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt). Weiterhin wurden auch Konkurrenzexperimente mit dem anti-NKG2D-Antikörper und fluoreszenzmarkiertem MICA-E<sub>8</sub>C durchgeführt, bei dem das an Zellen gebundene Protein durch den Antikörper verdrängt werden sollte (Daten nicht gezeigt). Sämtliche Konkurrenzexperimente und insbesondere die Kontrollexperimente ließen jedoch keine eindeutige Aussage über eine spezifische Bindung von MICA-E<sub>8</sub>C an NK-Zellen zu. Um auszuschließen, dass die polyionische Fusion eine mögliche Ursache dafür sein könnte, dass keine eindeutige Bindung nachgewiesen werden konnte, wurde

fluoreszenzmarkiertes MICA hinsichtlich seiner Bindungsfähigkeit an NK-Zellen untersucht. Es konnte jedoch ebenfalls keine eindeutige Bindung nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). So kann abschließend keine sichere Aussage darüber getroffen werden, ob der Immunligand MICA-E<sub>8</sub>C spezifisch an den NKG2D-Rezeptor auf NK-Zellen bindet bzw. wie spezifisch diese Bindung ist.

### 3.2.6 Herstellung des Immunkonjugates B3-MICA

Im Kontext eines Immunkonjugates sollte MICA die Rekrutierung und Aktivierung von NK-Zellen gegenüber Tumorzellen vermitteln. Hierzu wurde MICA-E<sub>8</sub>C an das tumorspezifische Antikörperfragment B3-R<sub>8</sub>CP anhand der angefügten polyionischen Fusionspeptide gekoppelt (vgl. Kapitel 3.1.4). Die gerichtete Assoziation wird unter geeigneten Bedingungen durch die elektrostatische Wechselwirkung der entgegengesetzt geladenen Fusionspeptide erreicht. Die kovalente Verknüpfung wird durch die Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen den zusätzlich in den polyionischen Fusionen eingefügten Cysteinen vermittelt (Richter *et al.*, 2001). Auf diese Weise konnten bereits verschiedene bifunktionelle Proteine hergestellt werden, welche in Zellkulturexperimenten biologisch aktiv waren (Kleinschmidt *et al.*, 2003; Bergelt *et al.*, 2009).

Zunächst wurde eine Kopplung analog zu der von B3-LLO durchgeführt. Die Proteine wurden mit reduziertem Glutathion (GSH) vorreduziert und das Reduktionsmittel anschließend mittels Gelfiltration (PD-10) abgetrennt. Danach wurden die Proteine äquimolar gemischt und durch den Zusatz von CuCl<sub>2</sub> zum Reaktionspuffer wurde die Oxidation der Thiolgruppen der Cysteine zu einer Disulfidbrücke durch Luftsauerstoff katalysiert. Die Kinetik der Reaktion wurde mittels SDS-PAGE analysiert. Dabei konnten bereits nach etwa 8-10 h gute Ausbeuten an B3-MICA Heterodimer erreicht werden (Daten nicht gezeigt).

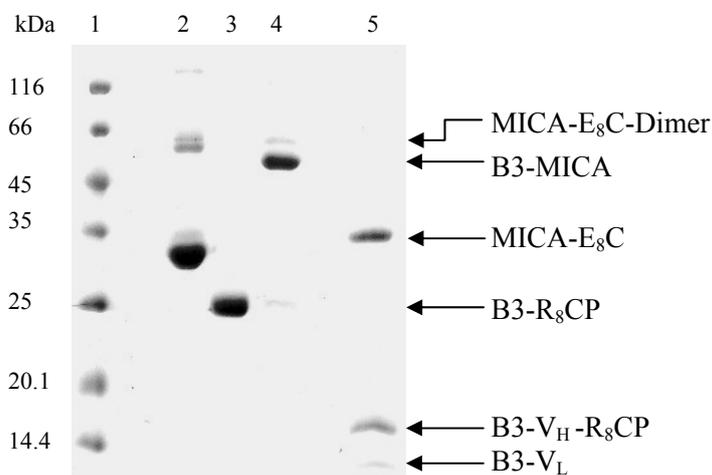


**Abbildung 3.26:** Kinetik der Kopplung von B3-R<sub>8</sub>CP und MICA-E<sub>8</sub>C. Je 6 μM Protein wurden in 20 mM Tris, 2 mM EDTA, 50 mM NaCl, 20 μM GSH, 80 μM GSSG, pH 8.0 inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben aus dem Reaktionsansatz entnommen und mittels 15 %-iger SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen untersucht.

(1) Marker; (2) MICA-E<sub>8</sub>C; (3) B3-R<sub>8</sub>CP; (4) Reaktionsansatz zum Zeitpunkt 0 min; (5) 30 min; (6) 1 h; (7) 2 h; (8) 3 h; (9) 4 h; (10) 5 h; (11) 6 h; (12) 8 h; (13) 24 h.

Problematisch war jedoch die Tatsache, dass es sich bei beiden Proteinen um disulfidverbrückte Proteine handelt. Somit stellten die Zeit der Vorreduktion und die anschließende Vorbereitung der

Proteine den limitierenden Faktor für eine hohe Ausbeute an Kopplungsprodukt dar. Da insbesondere MICA-E<sub>8</sub>C nach der Vorreduktion zur Oligomerisierung neigt, wurden die Kopplungsbedingungen weiter optimiert. Dabei wurde die Proteinkonzentration variiert und parallel dazu ein mikromolares Redox-*shuffling*-System, bestehend aus oxidiertem und reduziertem Glutathion (GSSG bzw. GSH), getestet. Dieses hat den Vorteil, dass die Vorreduktion entfallen kann und die Proteine vor der eigentlichen Kopplungsreaktion keine Nebenreaktionen wie Homodimerisierung oder Oligomerisierung eingehen können. Die optimalen Reaktionsbedingungen lagen bei einer Proteinkonzentration von jeweils 6 µM und einem Redox-*shuffling*-System, welches aus 20 µM GSH und 80 µM GSSG bestand. In Abbildung 3.26 ist die Kinetik der Kopplung von B3-R<sub>8</sub>CP und MICA-E<sub>8</sub>C dargestellt. Bereits nach wenigen Stunden ist eine deutliche Zunahme an B3-MICA Heterodimer zu erkennen. Jedoch nimmt die Menge des gebildeten Produktes ab etwa 8 h Reaktionszeit wieder ab, was mit der zunehmenden Aggregation des B3-MICA erklärt werden kann. Deutlich erkennbar sind auch die bereits in der Ausgangslösung von MICA-E<sub>8</sub>C enthaltenen Dimere, die unter den gegebenen Bedingungen nicht in Monomere zerfallen. Die größte Ausbeute an B3-MICA und die geringste Menge an Aggregaten findet sich nach etwa 4 h Reaktionszeit. Somit wurde die präparative Kopplung für 4 h bei 22 °C durchgeführt. Im Anschluss wurde die Proteinlösung mit 50 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0 verdünnt, um die NaCl-Konzentration für die Reinigung des Proteins abzusenken. Das bifunktionelle Konstrukt konnte dabei in einem Schritt über eine Anionenaustauschchromatographie-Säule gereinigt werden. B3-R<sub>8</sub>CP interagiert unter den gegebenen Bedingungen schwach bis gar nicht mit der Säulenmatrix, wohingegen ungekoppeltes MICA-E<sub>8</sub>C bei höheren NaCl-Konzentrationen eluierte als B3-MICA. Die Elution von B3-MICA erfolgte bei ca. 50 mM NaCl.



**Abbildung 3.27:** Herstellung des Immunkonjugates B3-MICA. Gezeigt ist ein 15 %-iges Coomassie gefärbtes SDS-Gel.

(1) Marker; (2) MICA-E<sub>8</sub>C; (3) B3-R<sub>8</sub>CP; (4) B3-MICA nach der Reinigung über den Anionentauscher und der Abtrennung der nicht gekoppelten Proteine; (5) gereinigtes B3-MICA unter reduzierenden Bedingungen. Das Konstrukt zerfällt dabei in die Proteine MICA-E<sub>8</sub>C, B3-V<sub>H</sub>-R<sub>8</sub>CP und B3-V<sub>L</sub>.

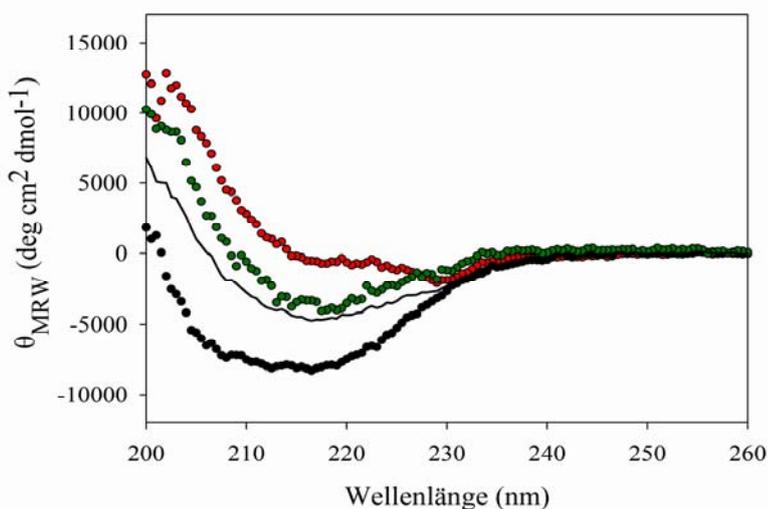
Die Proben (2)-(4) wurden mit nicht reduzierendem SDS-Probenpuffer versetzt, Probe (5) mit reduzierendem SDS-Probenpuffer.

Eine Zusammenfassung der Reinigung findet sich in Abbildung 3.27. In Spur 2 des SDS-Geles sind die Dimer- bzw. Oligomerbanden des MICA-E<sub>8</sub>C zu erkennen. Das Dimer des MICA-E<sub>8</sub>C zeigte

dabei ein ähnliches Elutionsverhalten wie B3-MICA und ließ sich damit bei der Reinigung nicht vollständig abtrennen. Dennoch konnten aus 1.27 mg B3-R<sub>8</sub>CP und 1.54 mg MICA-E<sub>8</sub>C insgesamt 850 µg des modularen Immunkonjugates B3-MICA bis zur fast vollständigen Homogenität gereinigt werden.

### 3.2.7 Untersuchungen zur Sekundärstruktur von B3-MICA

Durch die Untersuchung der Sekundärstruktur des Immunkonjugates B3-MICA sollte analysiert werden, inwiefern die Assoziation und kovalente Verknüpfung der Proteine einen Einfluss auf deren strukturelle Integrität besitzt. Durch die Aufnahme von Fern-UV-CD-Spektren und damit der Untersuchung der Sekundärstruktur sollte analysierbar sein, ob die Kopplung der Proteine einen Einfluss auf die strukturellen Eigenschaften hat.

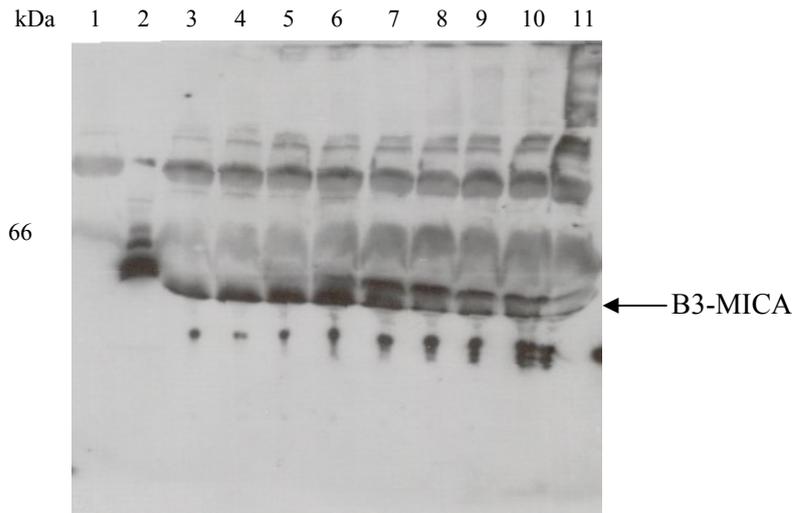


**Abbildung 3.28:** Fern-UV-CD-Spektren von B3-R<sub>8</sub>CP (●), MICA-E<sub>8</sub>C (●) und B3-MICA (●). Die Proteine waren in 25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 50 mM NaCl, pH 7.4 gelöst. Die Spektren wurden bei 20 °C in einer Quarzglaszuvette mit 0.5 mm Schichtdicke aufgenommen. Das nach Addition der mittleren residualen Elliptizität von B3-R<sub>8</sub>CP und MICA-E<sub>8</sub>C erhaltene Spektrum ist ebenfalls gezeigt (—).

In Abbildung 3.28 sind die Fern-UV-CD-Spektren der einzelnen Proteine B3-R<sub>8</sub>CP bzw. MICA-E<sub>8</sub>C und das des Konjugates B3-MICA dargestellt. Die gemessene Elliptizität wurde mit der unter 2.14.3 beschriebenen Formel in die mittlere residuale Elliptizität umgerechnet. Durch die Addition der Einzelspektren (vgl. Formel in Kapitel 2.14.3) der Proteine kann das theoretische Fern-UV-CD-Spektrum von B3-MICA berechnet werden. Unter Berücksichtigung der Messgenauigkeit zeigt das theoretische Spektrum einen ähnlichen Verlauf wie das tatsächlich gemessene Spektrum von B3-MICA. Im Vergleich zu B3-MICA zeigten auch das theoretische und gemessene Spektrum von B3-LLO keinen völlig identischen Verlauf (3.1.5). Dennoch konnte aufgrund der vorhandenen biologischen Aktivität des Immuntoxins von einer strukturellen Integrität der Proteine ausgegangen werden. D.h., dass auch bei B3-MICA trotz der leichten Differenzen in den Spektren die Assoziation und kovalente Verknüpfung der Proteine B3-R<sub>8</sub>CP und MICA-E<sub>8</sub>C vermutlich keinen größeren Einfluss auf deren Sekundärstrukturelemente hat.

### 3.2.8 Untersuchung der Stabilität des B3-MICA im Serum

Für den Einsatz in der Zellkultur sollte das bifunktionelle Konstrukt B3-MICA eine ausreichende Stabilität gegenüber den im Serum befindlichen Proteasen besitzen. Für die Untersuchung wurde B3-MICA zunächst für 11 h bei 37 °C in 10 % (v/v) FBS inkubiert und anschließend mittels Western Blot analysiert. Es konnte kein signifikanter Abbau des B3-MICA festgestellt werden, jedoch eine Oligomerisierung (Abbildung 3.29).



**Abbildung 3.29:** Kinetik zur Untersuchung der Stabilität von B3-MICA in fötalem Kälberserum. Je 1 µg des Proteins wurde in 10 % (v/v) FBS bei 37 °C inkubiert. Gezeigt ist ein Western Blot der Analyse. Sämtliche Proben wurden zur Vermeidung von Artefakten direkt nach der Probenentnahme mit 100 mM Jodacetamid inkubiert und anschließend mit nicht reduzierendem SDS-Probenpuffer versetzt. Nach der Gelelektrophorese schloss sich der Western Blot an, bei dem das Immunkonjugat B3-MICA durch einen anti-MICA-Antikörper detektiert wurde.

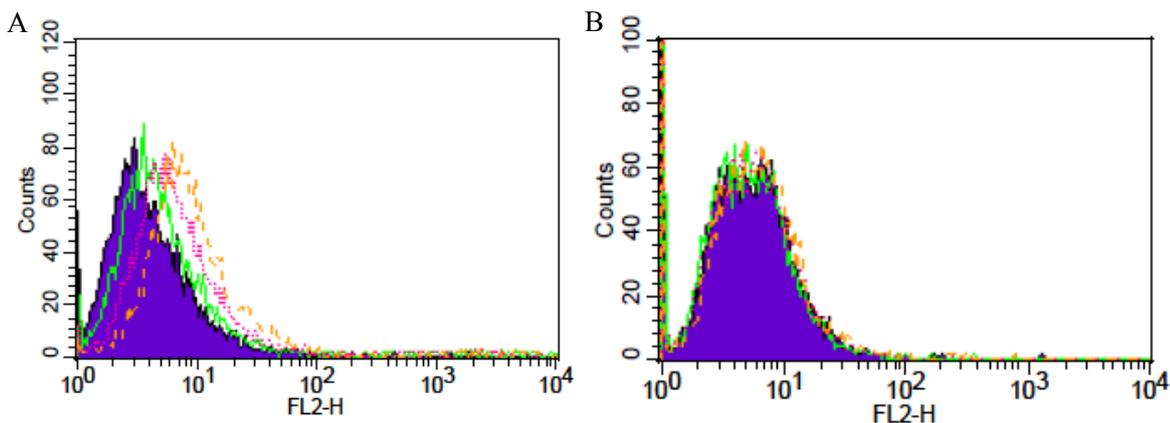
(1) 90 % (v/v) PBS + 10 % (v/v) FBS; (2) 90 % (v/v) B3-MICA + 10 % (v/v) PBS; (3) 90 % (v/v) B3-MICA + 10 % (v/v) FBS nach 1 min; (4) Reaktionsansatz (90 % (v/v) B3-MICA + 10 % (v/v) FBS) zum Zeitpunkt 10 min; (5) 20 min; (6) 30 min; (7) 1 h; (8) 2 h; (9) 4 h; (10) 6 h; (11) 24 h.

Der Western Blot zeigt, dass von den zahlreichen im Serum vorhandenen Proteinen lediglich ein Protein unspezifisch durch den anti-MICA-Antikörper detektiert wird (Spur 1). Bei der dominanten Bande in Spur 2 handelt es sich um B3-MICA, wohingegen die Banden darüber MICA-E<sub>8</sub>C-Dimere und Oligomere darstellen, die bei der Reinigung von B3-MICA nicht vollständig eliminiert werden konnten (vgl. Abbildung 3.27). In Spur 3 ist zu erkennen, dass B3-MICA direkt nach Inkubation in 90 % (v/v) PBS + 10 % (v/v) FBS eine Reaktion mit den im Serum befindlichen Proteinen eingeht. Da die Proben mittels Gelelektrophorese aufgetrennt wurden, kann es sich bei den gebildeten B3-MICA-Protein-Oligomeren nur um kovalent verknüpfte Oligomere handeln. Möglicherweise kommt es zu einer Disulfidverbrückung und damit Oligomerisierung zwischen B3-MICA, welches 2 freie Cysteine enthält, und anderen Serumproteinen mit zugänglichen Cysteinen. Die Menge an freiem B3-MICA nahm nach ca. 1 h Reaktionszeit deutlich ab. Nach einer Reaktionszeit von 24 h konnte kaum freies B3-MICA, jedoch eine signifikant erhöhte Menge an Oligomeren bzw. Aggregaten, beobachtet werden. Trotz der Reaktionen, die B3-MICA mit den im Serum befindlichen Proteinen eingeht, bleibt innerhalb eines Zeitraumes von etwa 1-2 h genügend freies B3-MICA vorhanden, so dass ein Einsatz

des Konstruktes in der Zellkultur unter Berücksichtigung der Verluste an B3-MICA stattfinden kann. Es konnte über die gesamte Reaktionszeit hinweg kein signifikanter Abbau an B3-MICA festgestellt werden.

### 3.2.9 Analyse der MICA-Expression von Tumorzelllinien

Vor einem Einsatz von B3-MICA in Zellkulturexperimenten mussten geeignete Zelllinien gefunden werden, die wenig oder kein MICA an der Zelloberfläche präsentieren. Bei MICA handelt es sich um keinen konstitutiv exprimierten NK-Zell-Liganden, sondern um ein Oberflächenprotein, dessen Expression durch zellulären Stress induziert wird (Groh *et al.*, 1996; 1998). Dabei findet sich MICA hauptsächlich auf Tumorzellen epithelialen Ursprungs sowie intestinale Epithel (Groh *et al.*, 1996; 1999). Bei einer starken Expression von MICA auf den Tumorzellen kann vermutlich nicht mehr zwischen MICA-vermittelter und B3-MICA-vermittelter Lyse der Tumorzellen durch NK-Zellen unterschieden werden. Da das Antikörperfragment B3-R<sub>s</sub>CP im Konstrukt B3-MICA an die Tumorzellen binden sollte, war neben dem MICA-Level auf der Zelloberfläche auch die Expression des Antigens Lewis Y von Bedeutung. In Abschnitt 3.1.2 und Tabelle 3.1 sind sämtliche verwendeten Zelllinien hinsichtlich ihrer Lewis Y-Expression analysiert und eingeordnet worden.



**Abbildung 3.30:** Analyse der Präsentation von MICA auf der Oberfläche zweier Lewis Y-positiver Zelllinien. Die Zellen wurden jeweils mit 1 µg/mL, 5 µg/mL bzw. 10 µg/mL Phycoerythrin-markiertem anti-MICA-Antikörper inkubiert.

(A) MICA-positive MCF7-Zellen (Lewis Y<sup>+</sup>) nach der Inkubation mit 1 µg/mL (—), 5 µg/mL (---) bzw. 10 µg/mL (---) fluoreszenzmarkiertem anti-MICA-Antikörper, MCF7 mit Isotypkontroll-Antikörper (lila).

(B) MICA-negative SKBR-3-Zellen (Lewis Y<sup>+</sup>) nach der Inkubation mit 1 µg/mL (—), 5 µg/mL (---) bzw. 10 µg/mL (---) fluoreszenzmarkiertem anti-MICA-Antikörper, SKBR-3 mit Isotypkontroll-Antikörper (lila).

Diese Lewis Y-positiven bzw. -negativen Zelllinien wurden nun hinsichtlich der Expression von MICA auf der Zelloberfläche untersucht. Idealerweise sollten sowohl die Lewis Y-positiven als auch die -negativen Zellen kein oder wenig MICA exprimieren. Für die Untersuchung wurden die Zellen wie unter 2.15.7.1 beschrieben mit einem Phycoerythrin-markierten anti-MICA-Antikörper inkubiert und am Durchflusszytometer analysiert. In Abbildung 3.30 sind repräsentativ die Histogramme einer MICA-positiven sowie MICA-negativen Zelllinie dargestellt. In Abbildung 3.30 (A) ist das Histogramm der Lewis Y-positiven Zelllinie MCF7 gezeigt. Die Bindung des fluoreszenzmarkierten

anti-MICA-Antikörpers an die Zellen führt zu einer Verschiebung der gesamten Zellpopulation hin zu höheren Fluoreszenzintensitäten. Die MCF7-Zellen zeigen somit eine moderate MICA-Expression. Die ebenfalls Lewis Y-positiven SKBR-3-Zellen zeigen nach der Inkubation mit dem anti-MICA-Antikörper keine Verschiebung der Zellpopulation hin zu höheren Fluoreszenzintensitäten, damit keine Bindung des Antikörpers und keine MICA-Expression (Abbildung 3.30 (B)). Anhand der Histogramme wurde die Expressionsrate an MICA auf den verschiedenen Zelllinien abgeschätzt. Eine Übersicht über die Expressionslevel an MICA auf den Lewis Y-positiven und -negativen Zelllinien gibt Tabelle 3.4.

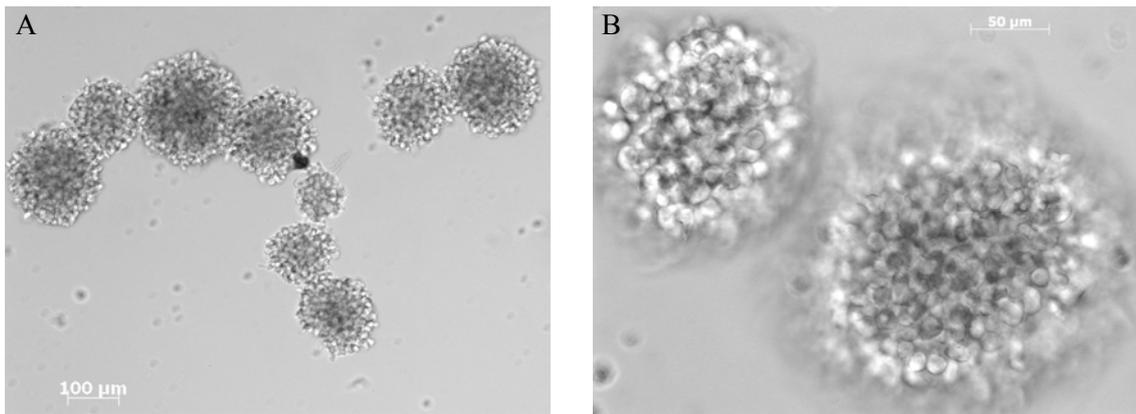
Tabelle 3.4: Übersicht über die Oberflächenexpression des NKG2D-Liganden MICA auf den in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien. (+ wenig MICA; - kein MICA)

<b>Lewis Y-positive Zelllinien</b>	<b>Expressionslevel MICA</b>	<b>Lewis Y-negative Zelllinien</b>	<b>Expressionslevel MICA</b>
MCF7	+	HeLa	+
SKBR-3	-	HT-29	-
A431	+		

Aus Tabelle 3.4 wird ersichtlich, dass lediglich je eine Lewis Y-positive bzw. -negative Zelllinie kein MICA auf der Zelloberfläche präsentieren (SKBR-3 und HT-29). Bei den anderen Zelllinien kann zwar MICA auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden, jedoch in einem moderaten Level, das nur eine geringe MICA-vermittelte Zellyse durch NK-Zellen erwarten lässt. Somit eignen sich sämtliche Zelllinien für eine Untersuchung der Aktivität des B3-MICA in der Zellkultur.

### 3.2.10 Charakterisierung der NK92-Zellen

Nachdem die verschiedenen Tumorzelllinien hinsichtlich ihrer MICA-Expression analysiert wurden, folgte im nächsten Schritt die Untersuchung der NK92-Zelllinie hinsichtlich ihrer Morphologie und NKG2D-Expression. Beide Untersuchungen dienten dem Nachweis der Identität der NK92-Zellen. Die zytotoxische, Interleukin-2-unabhängige Suspensionszelllinie NK92 (NK92 MI) tendiert zu einem Wachstum in Multi-Zellaggregaten (Gong *et al.*, 1994, Tam *et al.*, 1999), was visuell und mikroskopisch nachgewiesen werden kann (Abbildung 3.31). In Abbildung 3.31 (A) und (B) sind Durchlichtaufnahmen der Zelllinie NK92 gezeigt. In beiden Aufnahmen ((A) und (B)) sind deutlich die charakteristischen Multi-Zellaggregate zu erkennen. Während der gesamten Kultivierungszeit der NK92 war diese Wachstumsform stets ein Indikator für eine hohe Vitalität der Zellen.

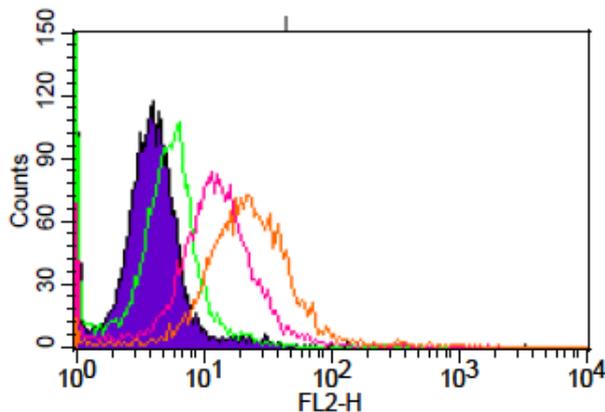


**Abbildung 3.31:** Untersuchung der Morphologie der NK92-Zelllinie, welche zu einem Wachstum in Multi-Zellaggregaten tendiert. Die Aufnahmen wurden an einem Fluoreszenzmikroskop gemacht.

(A) NK92-Zellen in Medium, Durchlichtaufnahme in 10-facher Vergrößerung.

(B) NK92-Zellen in Medium, Durchlichtaufnahme in 40-facher Vergrößerung.

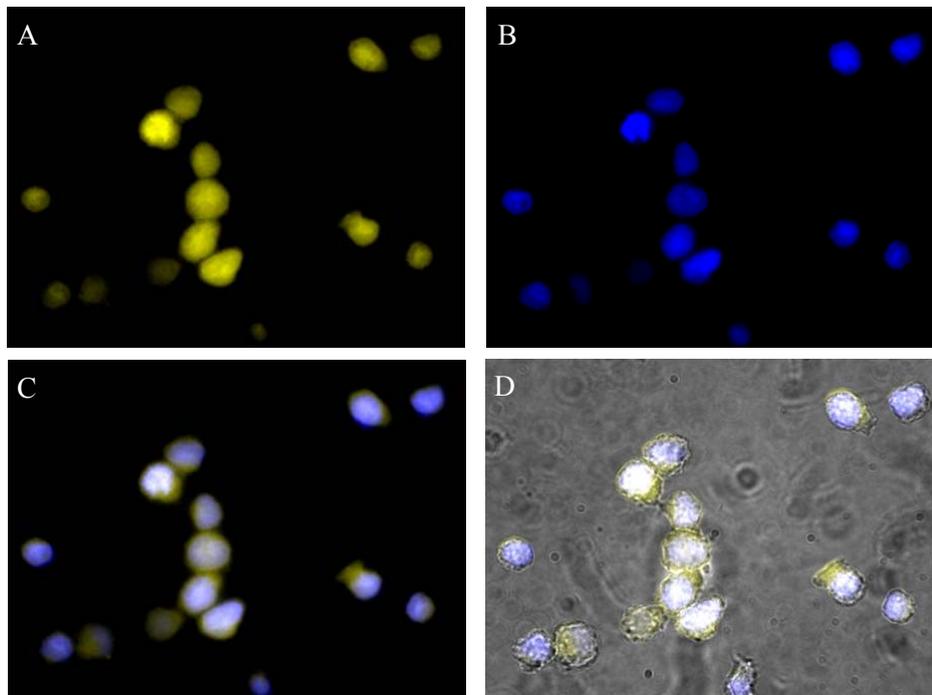
Ein wichtiges Kriterium für den Einsatz von B3-MICA in der Zellkultur ist das Vorhandensein des NKG2D-Rezeptors auf der NK-Zell-Oberfläche. Der aktivierende NK-Zell-Rezeptor NKG2D wird auf der Natürlichen Killer-Zelllinie NK92 exprimiert (Maki *et al.*, 2001), was sowohl mittels Durchflusszytometrie als auch Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden kann. Für die Analyse der NKG2D-Expression am Durchflusszytometer wurden die NK92 wie unter 2.15.7.1 beschrieben mit einem Phycoerythrin-markierten anti-NKG2D-Antikörper inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert.



**Abbildung 3.32:** Untersuchung der NKG2D-Expression auf der Oberfläche der Zelllinie NK92. Dargestellt ist das Histogramm nach der durchflusszytometrischen Analyse der Bindung des anti-NKG2D-Antikörpers an die Zellen. Die NK92-Zellen wurden mit jeweils 0,25 µg/mL (—), 6,25 µg/mL (—) bzw. 25 µg/mL (—) Phycoerythrin-markiertem anti-NKG2D-Antikörper inkubiert. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die mit 6,25 µg/mL Isotypkontroll-Antikörper (Phycoerythrin-markiert) inkubiert wurden (lila).

In Abbildung 3.32 ist das Histogramm nach der durchflusszytometrischen Analyse der Bindung des anti-NKG2D-Antikörpers an NK92 gezeigt. Durch die Inkubation mit dem fluoreszenzmarkierten Antikörper verschiebt sich die gesamte Zellpopulation hin zu höheren Fluoreszenzintensitäten, was auf die Bindung des Antikörpers und damit auf ein Vorhandensein des Rezeptors NKG2D hinweist. Um diese Untersuchung qualitativ zu verifizieren, wurden außerdem Fluoreszenzaufnahmen der Zellen angefertigt. Hierfür wurden die Suspensionszellen wie beschrieben (2.15.5.1) zunächst an ein Deckgläschen adhärirt und anschließend mit dem fluoreszenzmarkierten anti-NKG2D-Antikörper inkubiert. Die Analyse des Präparates erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop. In Abbildung 3.33

sind die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der NK92-Zellen nach der Inkubation mit dem fluoreszenzmarkierten anti-NKG2D-Antikörper dargestellt. Nach 1 Stunde Inkubationszeit konnte die Phycoerythrin-Fluoreszenz durch die Bindung des Antikörpers an die Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 3.33 (A)). Durch die Adhäsion der Zellen an das Deckgläschen wird die morphologisch runde Form der Zellen beibehalten, wodurch sich die Phycoerythrin- und DAPI-Fluoreszenz der Zellkerne (Abbildung 3.33 (B)) großteils überlagern (Abbildung 3.33 (C)). Die Antikörper-vermittelte Phycoerythrin-Fluoreszenz hebt sich dennoch von der DAPI-Fluoreszenz der Zellkerne ab. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die NK92-Zellen den Rezeptor NKG2D auf ihrer Zelloberfläche exprimieren. Die Spezifität der Antikörperbindung wurde durch Inkubation des anti-NKG2D-Antikörpers mit MCF7-Zellen und anschließender Analyse am Durchflusszytometer untersucht. Dabei konnte keine unspezifische Bindung des Antikörpers an die Zellen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Nach der Analyse der Tumorzellen und NK92-Zellen kann das bifunktionelle Konstrukt B3-MICA nun in Zellkulturexperimenten auf seine biologische Aktivität hin getestet werden.



**Abbildung 3.33:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von NK92-Zellen, die zur Analyse der NKG2D-Expression mit 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Phycoerythrin-markiertem anti-NKG2D-Antikörper inkubiert wurden. In (A) ist durch die Bindung des Antikörpers die Phycoerythrin-Fluoreszenz der Zellen zu sehen. (B) zeigt die DAPI-Fluoreszenz der Zellkerne. In Abbildung (C) ist die Überlagerung der Aufnahmen von (A) und (B) gezeigt. Aufnahme (D) zeigt die Überlagerung der Fluoreszenzaufnahmen (A) und (B) mit der Durchlichtaufnahme desselben Bildausschnittes.

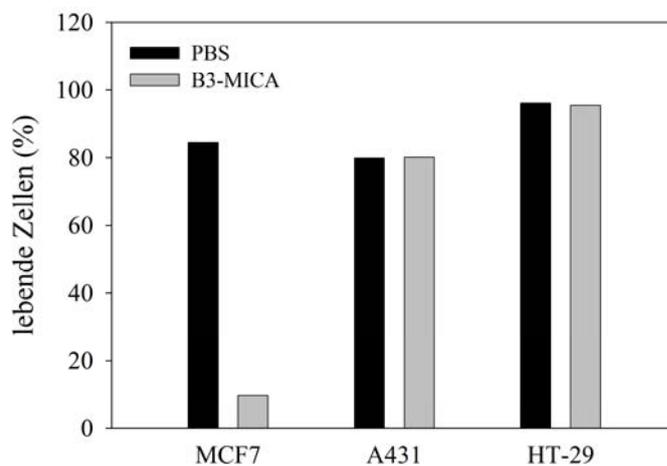
### 3.2.11 Aktivität von B3-MICA in der Zellkultur

Bei einem Einsatz in der Zellkultur ist das Antikörperfragment B3-R<sub>8</sub>CP für die spezifische Adressierung des Immunkonjugates B3-MICA an Antigen-positive Tumorzellen zuständig, wohingegen MICA-E<sub>8</sub>C die Bindung an und simultane Aktivierung von NK-Zellen vermitteln soll. Die

Interaktion der Proteine sollte seitens des B3-R<sub>8</sub>CP mit dem Antigen Lewis Y auf Tumorzellen, seitens des MICA-E<sub>8</sub>C mit dem aktivierenden NK-Zell-Rezeptor NKG2D auf NK92-Zellen erfolgen (vgl. Abbildung 3.13) Die simultane Bindung beider Proteine an die NK- bzw. Tumorzellen sollte letztlich zur Lyse und damit Eliminierung der Tumorzellen führen.

### 3.2.11.1 Zytotoxizität von B3-MICA

Um zu überprüfen, welchen Einfluss B3-MICA unabhängig von NK-Zellen auf die Targetzellen (Tumorzellen) ausübt, wurde in Analogie zum Immuntoxin B3-LLO die Zytotoxizität des B3-MICA analysiert. Bei dieser Untersuchung wurden Lewis Y-positive sowie Lewis Y-negative Zelllinien für 4 h mit unterschiedlichen Konzentrationen an B3-MICA inkubiert, anschließend mit Propidiumjodid inkubiert und am Durchflusszytometer hinsichtlich ihrer Vitalität analysiert.

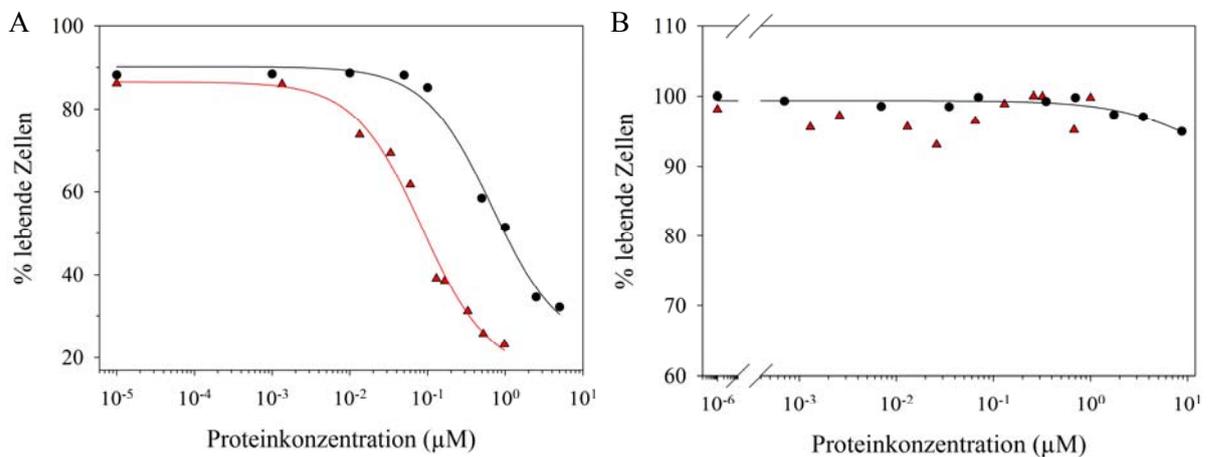


**Abbildung 3.34:** Biologische Aktivität des Immunkonjugates B3-MICA. Die Lewis Y-positiven Zelllinien MCF7 und A431 sowie die Lewis Y-negative Zelllinie HT-29 wurden mit PBS bzw. 0.38  $\mu$ M B3-MICA inkubiert. Es wird deutlich, dass B3-MICA lediglich auf MCF7 einen zytotoxischen Effekt hat, auf die ebenfalls Antigen-positiven A431-Zellen jedoch nicht. Für die Antigen-negative Zelllinie HT-29 zeigte B3-MICA, wie erwartet, keinen Effekt.

In Abbildung 3.34 ist ein Balkendiagramm dargestellt, welches die Wirkung des B3-MICA auf die Lewis Y-positiven Zelllinien MCF7 und A431 sowie die Antigen-negative Zelllinie HT-29 zeigt. Hierbei zeigte sich überraschenderweise, dass B3-MICA *per se* zytotoxisch auf die Lewis Y-positiven MCF7-Zellen wirkte. Eine Titration von B3-MICA zu MCF7-Zellen in Abwesenheit von NK-Zellen resultierte in einem EC<sub>50</sub>-Wert von 76 nM (Daten nicht gezeigt). Es trat jedoch keinerlei unspezifische Toxizität bei der Lewis Y-negativen Zelllinie HT-29 auf. Interessanterweise konnte auch bei den Lewis Y-positiven Zellen A431 kein zytotoxischer Effekt beobachtet werden. Durch frühere Studien mit Immuntoxinen (Frost, 2009) ist bekannt, dass die Zelllinie MCF7 das Antigen Lewis Y und daran gebundenes B3-R<sub>8</sub>CP internalisiert. Im Gegensatz dazu wird das Lewis Y der ebenfalls Lewis Y-positiven Zelllinie A431 nicht bzw. nur in geringem Maße internalisiert (Frost, 2009). Dies deutet darauf hin, dass der zytotoxische Effekt des B3-MICA mit einer Internalisierung in Antigen-positiven Zellen einhergeht. Die molekulare Grundlage für den zytotoxischen Effekt von MICA-E<sub>8</sub>C nach Internalisierung in die Zellen ist jedoch nicht bekannt.

### 3.2.11.2 B3-MICA im Kontext mit NK-Zellen

Es sollte die biologische Aktivität des bifunktionellen Konstruktes B3-MICA hinsichtlich seiner Fähigkeit, NK-Zellen zu rekrutieren und zu aktivieren, untersucht werden. Bei dieser Untersuchung kam der gemischte Zellkulturassay (2.15.7.3) zum Einsatz, bei dem NK-Zellen und Tumorzellen mit unterschiedlichen Proteinkonzentrationen an B3-MICA bzw. Kontrollproteinen simultan inkubiert wurden. Um anschließend zwischen den beiden Zelllinien am Durchflusszytometer unterscheiden zu können, wurden die Targetzellen (Tumorzellen) mit dem Farbstoff 3,3'-Diocetadecyloxycarbocyanin-perchlorat (Dio) *gelabelt*, welcher sich in die Zellmembran einlagert. Eine Konzentration von 3  $\mu\text{M}$  an Dio stellte sich zum *labeln* als optimal heraus. Bei höheren Konzentrationen wirkte Dio toxisch, bei niedrigeren Konzentrationen kam es zu keinem ausreichenden *labelling* der Zellen. Des Weiteren wurde das Effektor- (NK) zu Targetzell-Verhältnis optimiert. Hierzu wurde lediglich die Anzahl der NK-Zellen, bei einer konstanten Anzahl an Targetzellen und einer konstanten Konzentration an B3-MICA von 100 nM, variiert. Dabei stellte sich heraus, dass der maximale prozentuale Anteil toter Targetzellen bei einem 50-fachen Unterschuss an NK-Zellen vorlag (Daten nicht gezeigt). Der nächste Schritt zur Optimierung des Assays war die Variation der Inkubationszeit. Hierzu wurden mehrere Ansätze mit dem optimierten Effektor- zu Targetzell-Verhältnis und einer konstanten Konzentration an B3-MICA vorbereitet und zu verschiedenen Zeitpunkten am Durchflusszytometer analysiert. Bereits nach 4 h war der höchste prozentuale Anteil toter Targetzellen zu verzeichnen, wobei jedoch schon nach etwa 2 h ein Großteil der Targetzellen nicht mehr lebte (Daten nicht gezeigt). Mit diesen optimierten Bedingungen wurden im nächsten Schritt Titrationen durchgeführt, bei denen B3-MICA zu den Effektor- und Targetzellen titriert wurde. Das Zellverhältnis (E:T) lag bei 1:50.



**Abbildung 3.35:** Biologische Aktivität des Immunkonjugates B3-MICA. Verschiedene Zelllinien wurden mit B3-MICA inkubiert, um die Spezifität und Wirksamkeit des Immunkonjugates zu untersuchen. Als Positivkontrolle dienen die Lewis Y-positiven Zelllinien MCF7 und SKBR-3. Als Negativkontrolle die Lewis Y-negative Zelllinie HT-29. Die Zellen wurden für 2 h bei 37 °C mit verschiedenen Proteinkonzentrationen an B3-MICA und B3-R<sub>8</sub>CP inkubiert. Anschließend wurde der Anteil lebender bzw. toter Targetzellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Als Vergleich für die biologische Aktivität des B3-MICA wurden die Zellen auch mit den einzelnen Proteinen, B3-R<sub>8</sub>CP und MICA-E<sub>8</sub>C (nicht gezeigt) inkubiert. Die Linien repräsentieren die Anpassung an die experimentell gewonnenen Daten.

(A) Lewis Y-positiv MCF7-Zellen wurden mit B3-MICA (▲) und B3-R<sub>8</sub>CP (●) inkubiert. Mit den gleichen Proteinen wurde auch die Lewis Y-negative Zelllinie HT-29 inkubiert (B).

Für die Auswertung der Titrationsreihen wurden die Zellen mit Propidiumjodid versetzt und hinsichtlich ihrer Vitalität am Durchflusszytometer analysiert. Für jede Proteinkonzentration konnte der prozentuale Anteil lebender bzw. toter Zellen bestimmt werden. Aus den gewonnenen Daten konnten die  $EC_{50}$ -Werte des jeweiligen Proteins für die jeweilige Zelllinie bestimmt werden. In Abbildung 3.35 sind die Titrationsreihen exemplarisch für eine Antigen-positive sowie eine Antigen-negative Zelllinie dargestellt. Aus den Titrationskurven (Abbildung 3.35 (A)) wird ersichtlich, dass durch die Inkubation der Lewis Y-positiven MCF7-Zellen mit B3-MICA die Anzahl der lebenden Targetzellen mit steigenden Proteinkonzentrationen abnimmt. Jedoch hat auch die Inkubation mit dem Antikörperfragment B3-R<sub>8</sub>CP einen Effekt auf die Vitalität der Zellen, was allerdings durch frühere Studien bereits belegt war (unveröffentlichte Daten). Im Falle der Lewis Y-negativen HT-29-Zellen ist für beide Proteine kein Effekt zu beobachten. In Tabelle 3.5 sind die aus den Titrationsreihen bestimmten  $EC_{50}$ -Werte für die einzelnen Proteine und Zelllinien gelistet. Es wird ersichtlich, dass für die Lewis Y-negative Zelllinie HT-29 keine  $EC_{50}$ -Werte bestimmt werden konnten, da selbst bei hohen Proteinkonzentrationen kein Effekt auf die Zellvitalität zu beobachten war. Für die Lewis Y-positiven MCF7-Zellen konnte für B3-MICA ein  $EC_{50}$ -Wert von 85 nM bestimmt werden. Die ebenfalls Lewis Y-positiven SKBR-3-Zellen zeigten mit 1450 nM für B3-MICA einen deutlich höheren  $EC_{50}$  als MCF7. Dies könnte auf das geringere Expressionslevel von Lewis Y auf der Zelloberfläche von SKBR-3 zurückzuführen sein.

Tabelle 3.5: Übersicht über die aus den Zellkulturexperimenten ermittelten  $EC_{50}$ -Werte für die verschiedenen Proteine und Zelllinien.

Protein	$EC_{50}$ -Werte (nM)		
	MCF7 (Lewis Y <sup>+</sup> )	SKBR-3 (Lewis Y <sup>+</sup> )	HT-29 (Lewis Y <sup>-</sup> )
B3-MICA	85	1450	n.b. <sup>1)</sup>
B3-R <sub>8</sub> CP	680	3200	n.b.
MICA-E <sub>8</sub> C	n.b.	---	---

<sup>1)</sup> n.b. nicht bestimmbar

Eine Inkubation von MICA-E<sub>8</sub>C mit den Zelllinien führte zu keinem Effekt und damit zu keiner auswertbaren Titrationskurve (Daten nicht gezeigt). Es lässt sich daraus schließen, dass freies MICA-E<sub>8</sub>C keinen Effekt auf die NK-Zellen hat. Dies steht in Übereinstimmung mit der Erkenntnis, dass der lösliche NKG2D-Ligand ULBP2 keinen Einfluss auf die IFN $\gamma$ -Sekretion und damit auf die Aktivität von NK-Zellen hat (von Strandmann *et al.*, 2006).

Eine Titration von B3-MICA zu MCF7-Zellen in Abwesenheit von NK-Zellen resultierte in einem  $EC_{50}$ -Wert von 76 nM (Daten nicht gezeigt). Dies bedeutet, dass der Effekt des B3-MICA allein auf die zytotoxische Wirkung des B3-MICA (siehe 3.2.11.1) und nicht auf die Aktivierung und Zytotoxizität der NK-Zellen, welche mit B3-MICA interagieren sollten, zurückzuführen ist. Auf Basis dieser Erkenntnisse wurde der gemischte Zellkulturassay mit den ebenfalls Lewis Y-positiven A431-Zellen, die nicht auf B3-MICA reagieren, durchgeführt (siehe 3.2.11.1). Bei dem gemischten Zellkulturassay wurden höhere Konzentrationen an B3-MICA verwendet und die Inkubationszeit auf 6 h ausgedehnt. Als Kontrollen wurden A431-Zellen nur mit NK92 und nur mit B3-MICA inkubiert.

Es konnte jedoch nach der durchflusszytometrischen Analyse kein zytotoxischer Effekt bei den A431-Zellen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Dies bedeutet, dass durch die simultane Bindung des B3-MICA an die A431- und NK-Zellen keine Aktivität der NK-Zellen und damit keine Zellyse der Tumorzellen herbeigeführt werden konnte. Da bis zu diesem Zeitpunkt noch keine eindeutig spezifische Bindung des MICA-E<sub>8</sub>C an NK-Zellen nachgewiesen werden konnte, wurde in den nächsten Schritten analysiert, ob eine Aktivierung der NK-Zellen durch MICA-E<sub>8</sub>C erreicht werden kann. Weiterhin wurde untersucht, inwiefern die NK92-Zellen aktivierbar sind und die Aktivität nachweisbar ist.

Somit bleibt festzuhalten, dass die Wirkung des B3-MICA als Immuntoxin mit der Internalisierung des Antigens Lewis Y einhergeht. Es konnten dabei keinerlei unspezifische zytotoxische Effekte bei Lewis Y-negativen Zelllinien beobachtet werden. Eine Wirkung des B3-MICA als Immunkonjugat, welches NK-Zellen rekrutieren und simultan aktivieren sollte, konnte bisher jedoch nicht erreicht werden.

#### **3.2.12 Aktivität der NK92-Zellen**

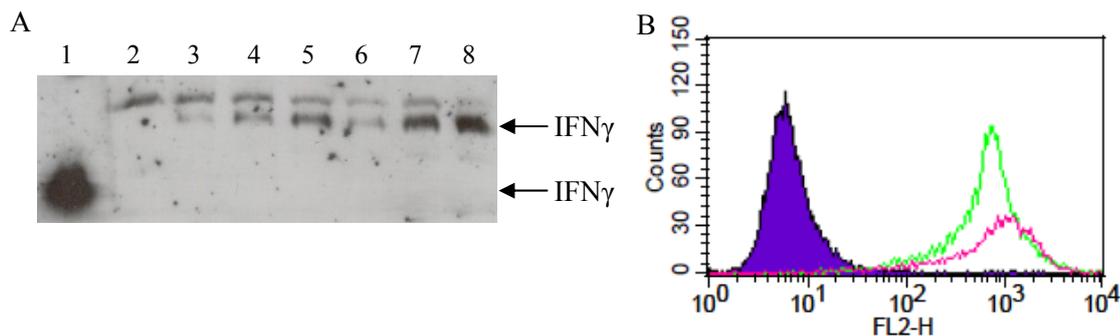
Im Kapitel 3.2.10 wurde bereits gezeigt, dass die verwendete Zelllinie NK92 die typische Morphologie dieser Zelllinie aufweist und in so genannten Multi-Zellaggregaten wächst. Weiterhin konnte die Expression des NK-Zell-Rezeptors NKG2D nachgewiesen werden. In diesem Abschnitt soll speziell auf die Aktivität dieser hoch zytotoxischen Zelllinie eingegangen werden. Die Aktivierung der NK-Zellen umfasst die Produktion des Zytokins IFN $\gamma$ , die Produktion diverser Chemokine sowie die zytotoxische Aktivität gegenüber der sehr sensitiven Zelllinie K-562 (West *et al.*, 1977; Vitale *et al.*, 1991; Zamai *et al.*, 1998).

##### **3.2.12.1 IFN $\gamma$ -Produktion der NK92-Zellen**

Vor der eigentlichen Analyse der IFN $\gamma$ -Produktion der Zellen war zunächst die Etablierung einer Positivkontrolle notwendig. Durch den Zusatz von niedermolekularen Substanzen, wie dem Ca<sup>2+</sup> Ionophor Ionomycin und dem Proteinkinase C-Aktivator Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA), zu den NK-Zellen kann die Produktion von Zytokinen, speziell IFN $\gamma$ , stimuliert werden (Heckford *et al.*, 1986). Durch den Zusatz des Ionophors Brefeldin A zu den stimulierten Zellen wird die Sekretion des IFN $\gamma$  in das Medium verhindert, da Brefeldin A den Transport des Zytokins in ein prä-Golgi-Kompartiment blockiert (Klausner *et al.*, 1992). Die Inkubation der NK92-Zellen mit den Reagenzien erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Foster *et al.* (2007). Im Anschluss an die Stimulation wurde das gebildete IFN $\gamma$  mittels Western Blot oder durch intrazelluläre Färbung der Zellen mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper am Durchflusszytometer detektiert (vgl. Kapitel 2.15.6).

In Abbildung 3.36 sind ein Western Blot und ein Histogramm der Analyse der IFN $\gamma$ -Produktion nach der Stimulation der NK92-Zellen gezeigt. Der Western Blot in Abbildung 3.36 (A) zeigt in Abhängigkeit von der eingesetzten Zellzahl sowie Inkubationszeit eine unterschiedliche Menge an produziertem IFN $\gamma$ . Als Referenz diente IFN $\gamma$  (Sigma-Aldrich), welches aufgrund der rekombinanten Herstellung keine Protein-Glykosylierung besitzt und damit eine molekulare Masse von etwa 17 kDa aufweist. Das in den Zellen produzierte IFN $\gamma$  besitzt aufgrund der Glykosylierung eine molekulare

Masse von 20-25 kDa und läuft somit im SDS-Gel höher als das rekombinant gewonnene IFN $\gamma$ . Weiterhin ist noch die unspezifische Detektion eines Proteins durch den anti-IFN $\gamma$ -Antikörper zu erkennen. Es kann jedoch festgehalten werden, dass im Vergleich zur Negativkontrolle (unstimulierte Zellen, Spur 2) eindeutig die Produktion von IFN $\gamma$  durch die Zelllinie NK92 nachgewiesen werden konnte. Die Verifizierung dieses Ergebnisses erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Hier konnte im Vergleich zur Negativkontrolle eine Verschiebung der gesamten Zellpopulation stimulierter Zellen hin zu höheren Fluoreszenzintensitäten, hervorgerufen durch die Bindung des fluoreszenzmarkierten anti-IFN $\gamma$ -Antikörpers an das gebildete IFN $\gamma$ , und damit die Produktion von IFN $\gamma$  durch die NK92-Zellen beobachtet werden (Abbildung 3.36 (B)). Da die NK92-Zellen in der Lage sind, durch die Stimulation mit Ionomycin und PMA IFN $\gamma$  zu bilden, wurde nun die MICA-E $\delta$ C-vermittelte Aktivität der NK-Zellen untersucht. Zunächst wurde freies MICA-E $\delta$ C in poly-D-Lysin-beschichteten 6-well-Platten immobilisiert und anschließend NK92-Zellen zugesetzt. Bei von Strandmann *et al.* (2006) konnte der immobilisierte NKG2D-Ligand ULBP2 die Sekretion von IFN $\gamma$  auslösen, wohingegen der freie Ligand dazu nicht in der Lage war. Die Immobilisierung simulierte dabei das Vorhandensein einer Zelloberfläche.



**Abbildung 3.36:** Untersuchung der IFN $\gamma$ -Produktion der Zelllinie NK92 nach der Stimulation mit 1  $\mu$ g/mL Ionomycin und 5  $\mu$ g/mL Phorbol-12-Myristat-13-Acetat. Nach 2 h Inkubation wurde den Zellen 20  $\mu$ g/mL Brefeldin A zugesetzt. Gezeigt sind ein Western Blot (A) und das Histogramm nach der durchflusszytometrischen Analyse der Zellen (B).

(A) Nach dem Zusatz von Brefeldin A wurden die Zellen für 6 h bzw. 8 h weiter inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und mit nicht-reduzierendem SDS-Probenpuffer versetzt. Nach der Auftrennung der Proben mittels SDS-PAGE schloss sich ein Western Blot und die Detektion des IFN $\gamma$  mit einem anti-IFN $\gamma$ -Antikörper an.

(1) IFN $\gamma$  (Sigma Aldrich); (2) 100000 unstimulierte NK92; (3)-(5) 50000, 100000, 250000 stimulierte Zellen nach 6 h Inkubation; (6)-(8) 50000, 100000, 250000 stimulierte Zellen nach 8 h Inkubation.

(B) Histogramm der durchflusszytometrischen Analyse der stimulierten Zellen. Den Zellen wurde ebenfalls nach 2 h Brefeldin A zugesetzt und für 6 h (—) bzw. 8 h (—) weiter inkubiert. Die intrazelluläre Färbung des IFN $\gamma$  erfolgte durch einen Phycoerythrin-markierten anti-IFN $\gamma$ -Antikörper. Als Negativkontrolle dienten stimulierte Zellen, die mit einem Isotypkontroll-Antikörper inkubiert wurden (lila) und unstimulierte Zellen (nicht gezeigt). Die unstimulierten Zellen zeigten die gleiche Fluoreszenzintensität wie die Isotypkontrolle.

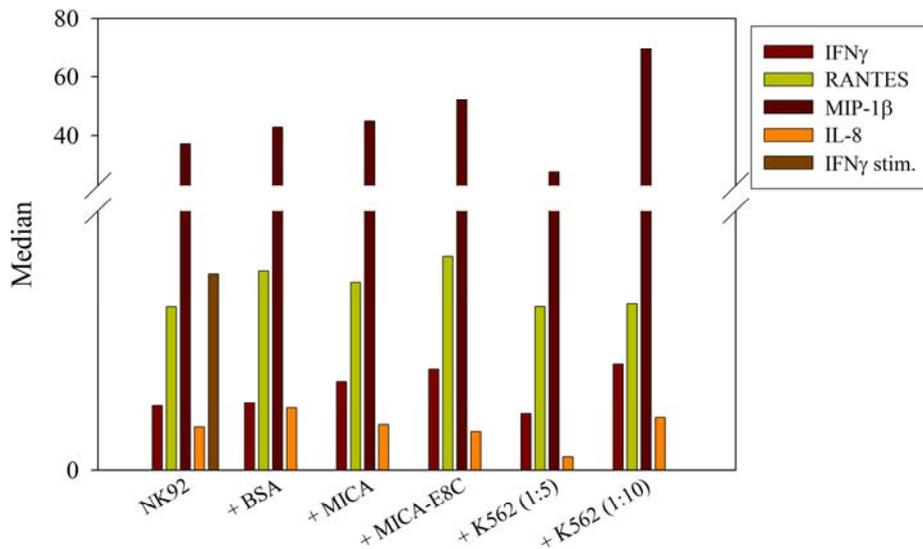
Durch die Interaktion des MICA-E $\delta$ C mit dem Rezeptor NKG2D sollten die NK-Zellen aktiviert und die IFN $\gamma$ -Produktion stimuliert werden. Nach der Immobilisierung von MICA-E $\delta$ C wurden unterschiedliche Mengen an NK92-Zellen zugesetzt. Nach 1 h Inkubation folgte der Zusatz von Brefeldin A und die Zellen wurden für wenigstens 8 h weiter inkubiert. Eine mögliche IFN $\gamma$ -Produktion wurde

sowohl mittels Western Blot als auch durchflusszytometrisch untersucht. Es konnte jedoch keine IFN $\gamma$ -Bildung nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Es gibt jedoch Hinweise, dass die Stimulation des aktivierenden Rezeptors NKG2D auf NK-Zellen zwar zur Aktivität und damit Zytotoxizität der Zellen führt, jedoch nicht zwangsläufig mit der Sekretion von IFN $\gamma$  einhergehen muss (Billadeau *et al.*, 2003; Zompi *et al.*, 2003). Insbesondere, da es sich bei NK92 um eine kommerzielle Zelllinie und nicht um primäre Zellen handelt, ist nicht eindeutig belegt, ob die NK92-Zellen durch die NKG2D-vermittelte Aktivierung IFN $\gamma$  produzieren. Da jedoch bislang keine eindeutige Bindung des MICA-E $_8$ C an die NK92-Zellen nachgewiesen werden konnte, bleibt unklar, ob eine Bindung der Zellen an immobilisiertes MICA-E $_8$ C stattfand und kein IFN $\gamma$  produziert wurde oder ob von vornherein die Zellen nicht mit dem Protein MICA-E $_8$ C interagierten.

#### 3.2.12.2 Produktion von Chemokinen durch NK92-Zellen

Da laut Literatur eine Aktivierung der NK-Zellen nicht zwingend mit einer IFN $\gamma$ -Produktion einhergeht, wurde zur Untersuchung der Aktivität der NK-Zelllinie NK92 analysiert, inwiefern die Zellen in der Lage sind, unterschiedliche Chemokine zu produzieren. Bei Chemokinen handelt es sich um *chemotaktische Zytokine*, welche zur Anlockung von Immunzellen von verschiedenen Zellen, unter anderem NK-Zellen, sezerniert werden. Die Analyse der Chemokin-Produktion wäre demnach ein Marker für die Aktivität der NK-Zellen. Zudem ließe sich untersuchen, inwiefern eine Bindung des Proteins MICA-E $_8$ C an den NK-Zell-Rezeptor NKG2D zur Aktivität der Zellen führt. In einer Studie von Fauriat *et al.* (2010) wurden einzelne Ligand-NK-Zell-Rezeptor-Interaktionen untersucht. Dabei konnte analysiert werden, welche Rezeptorbindung zur Produktion von Chemokinen führte. Für den NK-Zell-Rezeptor NKG2D konnte durch die Bindung eines seiner Liganden (ULBP1) die Produktion verschiedener Zytokine und Chemokine nachgewiesen werden. Hier erwiesen sich Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), das Makrophagen-Inflammatorische Protein-1 $\beta$  (MIP-1 $\beta$ ), Interleukin-8 (IL-8) und RANTES (CCL5) als geeignete Marker. Daher wurden die NK92-Zellen allein (Negativkontrolle), in Anwesenheit von K-562-Zellen (Positivkontrolle) oder in Anwesenheit von BSA, MICA bzw. MICA-E $_8$ C inkubiert. Die Proteine wurden in eine poly-D-Lysin-beschichtete 6-*well*-Platte immobilisiert, wobei BSA als Kontrollprotein diente. Nach einer Inkubationszeit von 1 h wurde Brefeldin A zugesetzt, um die Sekretion der gebildeten Chemokine zu unterdrücken. Nach weiteren 5 h Inkubation wurden die Zellen geerntet, fixiert, permeabilisiert und mit den Phycoerythrin-markierten Antikörpern, gegen die unterschiedlichen Chemokine, intrazellulär gefärbt (2.15.7.1). Als Referenz diente die Färbung mit einem Phycoerythrin-markierten Isotypkontroll-Antikörper. In Abbildung 3.37 ist die Analyse der Chemokin-Produktion der NK92-Zellen gezeigt. Die Auswertung erfolgte am Durchflusszytometer durch Histogramme. In dem gezeigten Balkendiagramm wurde der Median der Phycoerythrin-Fluoreszenz aufgetragen. Sowohl die Inkubation mit verschiedenen Proteinen als auch die Inkubation mit K-562-Zellen führte zu keinem signifikanten Anstieg der Bildung eines Chemokins. Lediglich zwischen IFN $\gamma$ , dessen Produktion durch den Zusatz von Ionomycin und PMA stimuliert wurde und dem Hintergrundlevel an IFN $\gamma$  ist ein Unterschied bei den NK92 erkennbar. Hier wurde jedoch ein wesentlich größerer Unterschied erwartet, da im Western Blot gezeigt werden konnte, dass die Stimulation der IFN $\gamma$ -Produktion zu einem signifikanten Anstieg an gebildetem IFN $\gamma$  führte, wohingegen unbehandelte Zellen kein IFN $\gamma$  produzierten (Abbildung 3.36). Dies zeigt jedoch auch, dass nicht klar war, welche Unterschiede zu erwarten waren und welcher Unterschied signifikant wäre.

Da es sich bei der Studie von Fauriat *et al.* (2010) um primäre NK-Zellen und nicht um eine Zelllinie handelte, können hier also keine Vergleiche gezogen werden. Da die Zelllinie NK92 von der phänotypischen und funktionellen Charakteristik her als aktivierte NK-Zellen geführt werden (Gong *et al.*, 1994) könnte es jedoch auch möglich sein, dass die Zellen nicht aktivierbar sind, da sie bereits ständig aktiv sind.



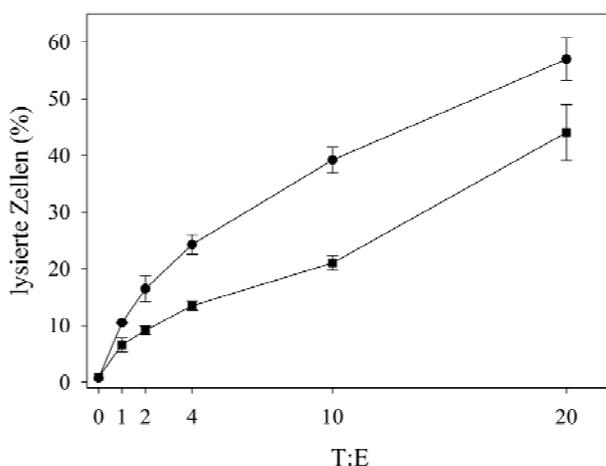
**Abbildung 3.37:** Analyse der Chemokin-Produktion der NK92-Zellen. Nach der intrazellulären Färbung mit den fluoreszenzmarkierten Antikörpern wurde der Median anhand der Histogramme am Durchflusszytometer bestimmt. Der Median der Phycoerythrin-Fluoreszenz wurde in einem Balkendiagramm dargestellt. Gezeigt sind NK92-Zellen (Negativkontrolle), NK92, die mit BSA, MICA und MICA-E<sub>8</sub>C inkubiert wurden, wobei BSA als Kontrollprotein diente. Weiterhin wurde die Chemokin-Produktion der NK92 nach der Inkubation mit K-562-Zellen in den Verhältnissen 1:5 und 1:10, d.h. 5- bzw. 10-facher Überschuss an NK-Zellen, analysiert (Positivkontrolle). Als zusätzliche Kontrolle wurden die NK92-Zellen mit Ionomycin und PMA stimuliert, was die Produktion von IFN $\gamma$  bewirkt.

In diesem Falle könnte die Untersuchung der Chemokin-Produktion bereits das Maximum dessen zeigen, was an Chemokinen von dieser Zelllinie produziert wird. Es wird jedoch deutlich, dass die Untersuchung von gebildeten Chemokinen in diesem Fall nicht als Marker für die Aktivierbarkeit der NK92-Zellen dienen kann. Somit kann letztlich keine Aussage darüber getroffen werden, inwiefern MICA-E<sub>8</sub>C durch die Bindung an den NK-Zell-Rezeptor NKG2D zu einer Aktivierung und Zytotoxizität der NK92-Zellen führt bzw. konnte nicht geklärt werden, ob eine Interaktion zwischen Ligand und dem Rezeptor stattfindet.

### 3.2.12.3 Zytotoxizität der NK92-Zellen

Da in den bisherigen Studien keine NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität und keine MICA-E<sub>8</sub>C-vermittelte Aktivität gegenüber verschiedenen Targetzelllinien nachgewiesen werden konnte, wurde in diesem Abschnitt die Zytotoxizität der NK-Zellen untersucht. Die Zelllinie K-562, bei der es sich um Lymphoblasten einer chronisch myeloischen Leukämie handelt, reagiert sehr sensitiv gegenüber NK-Zellen, weshalb sie häufig als Targetzelllinie in NK-Zell basierten Assays verwendet wird (Ortaldo *et*

*al.*, 1977; West *et al.*, 1977). Sie präsentiert keine MHC Klasse I-Moleküle auf der Zelloberfläche und stellt damit ein *target* für NK-Zellen dar (Kornbluth *et al.*, 1985). Um die Aktivität und damit Zytotoxizität der NK92-Zellen zu untersuchen, wurden die NK92 mit K-562 in unterschiedlichen Zellverhältnissen inkubiert. Um bei der Analyse am Durchflusszytometer zwischen NK92 und K-562 unterscheiden zu können, wurden die K-562-Zellen vor der Inkubation mit Dio *gelabelt* (vgl. Kapitel 3.2.11). Anschließend wurde der prozentuale Anteil toter K-562-Zellen durch Färbung mit Propidiumjodid und durchflusszytometrische Analyse bestimmt. Der gemischte Zellkulturassay wurde durchgeführt wie unter 2.15.7.3 beschrieben, ohne Zusatz von Proteinen und mit Inkubationszeiten von 2 h und 4 h.

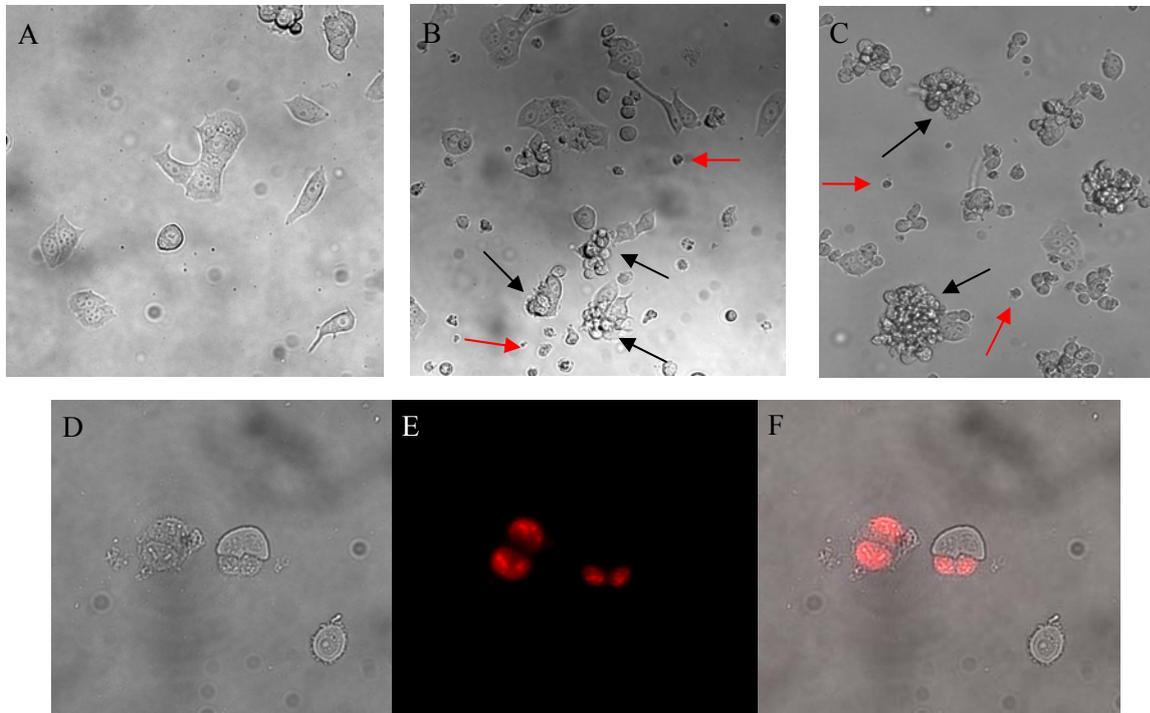


**Abbildung 3.38:** Untersuchung der NK92-vermittelten Zytotoxizität gegenüber K-562-Zellen. Die Zellen wurden in verschiedenen Target- (K-562) zu Effektor (NK92)-Zellverhältnissen gemischt und für 2 h (■) bzw. 4 h (●) bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit Propidiumjodid inkubiert und am Durchflusszytometer analysiert. Durch das *labelling* der K-562-Zellen mit dem fluoreszierenden Farbstoff Dio war eine Unterscheidung zwischen NK92 und K-562 möglich. Die Auswertung erfolgte mittels *Dotplots*. In der Abbildung ist der prozentuale Anteil lysierter K-562-Zellen gegen das Target zu Effektor (T:E)-Verhältnis aufgetragen, wobei T = 1 und der jeweilige Effektoranteil auf der x-Achse dargestellt ist.

In Abbildung 3.38 ist die NK-Zell-vermittelte Lyse von K-562-Zellen dargestellt. Sowohl das Target- zu Effektorzell-Verhältnis als auch die Inkubationsdauer sind entscheidend für die Lyse der K-562-Zellen. Es wird deutlich, dass bei einem Zellverhältnis T:E von 1:20, also einem 20-fachen Überschuss an NK92, nach 4 h Inkubationszeit etwa 60 % der K-562-Zellen tot sind. Die gewonnenen Daten stehen damit in guter Übereinstimmung zu Daten aus der Literatur (Zamai *et al.*, 1998; Wex *et al.*, 2003). Bei einer Inkubation der NK92 mit MCF7-Zellen (T:E 1:5) wurden unter den gleichen Bedingungen erst nach 15 h – 20 h 40 – 50 % tote Zellen detektiert (Daten nicht gezeigt). Da MCF7-Zellen jedoch adhärent wachsen, ließ sich die NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität mikroskopisch dokumentieren (Abbildung 3.39).

In Abbildung 3.39 sind die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von MCF7-Zellen gezeigt, die mit NK92-Zellen inkubiert wurden. Für die mikroskopischen Aufnahmen wurde das Medium entfernt. Bereits nach wenigen Stunden konnte eine Bindung der NK92-Zellen an MCF7 beobachtet werden (Abbildung 3.39 (B), schwarze Pfeile). Die NK-Zellen heben sich dabei deutlich von den MCF7-Zellen ab (vgl. Abbildung 3.39 (A)). Außerdem konnten bereits einige tote MCF7-Zellen beobachtet werden, deren Anteil mit fortschreitender Inkubationsdauer zunahm (markiert durch rote Pfeile in Abbildung 3.39 (B) und (C)). Nach einer Inkubationsdauer von 5.5 h lagerten sich größere Zellaggregate der NK92 an die MCF7 an (Abbildung 3.39 (C)).

Nach einer Inkubationsdauer von 20 h mit den NK92 konnten durch die Propidiumjodid-Fluoreszenz eindeutig tote MCF7-Zellen identifiziert werden. Die toten Zellen zeigten bereits in der Durchlichtaufnahme deutliche Unterschiede im Vergleich zu den lebenden Zellen (Abbildung 3.39 (D)-(F)).



**Abbildung 3.39:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von MCF7-Zellen, welche über einen Zeitraum von 48 h mit einem 5-fachen Überschuss an NK92-Zellen (T:E 1:5) inkubiert wurden. Die Aufnahmen wurden nach 3.5 h (A, B), 5.5 h (C) und 20 h (D, E, F) gemacht.

In (A) sind MCF7-Zellen ohne NK92 gezeigt. (B) Bereits 3.5 h nach dem Zusatz von NK-Zellen konnte eine Bindung der NK92 an die MCF7-Zellen beobachtet werden (schwarze Pfeile), ebenso wie erste tote MCF7-Zellen detektiert werden konnten (rote Pfeile). (C) Nach 5.5 h Inkubation lagerten sich bereits größere Zellcluster der NK92 an MCF7-Zellen an (schwarze Pfeile). Es wurden außerdem tote MCF7-Zellen beobachtet (rote Pfeile).

Abbildung (D)-(F) zeigt MCF7-Zellen, die nach 20 h Inkubation mit den NK92-Zellen mit Propidiumjodid inkubiert wurden, um tote Zellen anzufärben. Vor der Aufnahme der Bilder wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. In (D) ist die Durchlichtaufnahme der MCF7-Zellen zu sehen. Die toten MCF7 unterscheiden sich deutlich von den lebenden Zellen. (E) zeigt im selben Bildausschnitt die Propidiumjodid-Fluoreszenz der toten Zellen. In (F) ist die überlagerte Aufnahme von (D) und (E) gezeigt.

Obwohl MCF7-Zellen weniger sensitiv gegenüber NK92 reagieren als K-562-Zellen, werden sie dennoch lysiert, was unter anderem auch auf die moderate Expression von MICA auf den MCF7-Zellen zurückzuführen sein könnte. Die Inkubation von MICA-negativen SKBR-3-Zellen mit NK92 führte ebenfalls zur Lyse der Zellen, jedoch deutlich langsamer. So waren hier Inkubationszeiten von 72 h und mehr notwendig, bevor wenigstens 90 % der Zellen lysiert wurden (Daten nicht gezeigt). Es lässt sich somit festhalten, dass die NK92-Zellen zytotoxisch gegenüber verschiedenen Zelllinien wirken und somit prinzipiell aktiv sind. Vermutlich spielen für die Zelllyse jedoch noch weitere Faktoren, neben der MICA-NKG2D-Interaktion, eine Rolle.

### 3.2.13 Zusammenfassung

In diesem Abschnitt der Arbeit wurde die Herstellung, Charakterisierung und biologische Aktivität des modularen Immunkonjugates B3-MICA beschrieben. Während das Antikörperfragment B3-R<sub>8</sub>CP die Bindung an Tumorzellen vermittelt, bestand die Aufgabe des MICA-E<sub>8</sub>C in der Bindung des NKG2D-Rezeptors auf Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und deren simultaner Aktivierung. Dies sollte letztlich zur Eliminierung von Tumorzellen durch die NK-Zellen führen. Zunächst wurden das Protein MICA, welches als Ligand für den aktivierenden NK-Zell-Rezeptor NKG2D dient, und dessen polyionische Variante, MICA-E<sub>8</sub>C, hergestellt. Die beiden Proteine wurden nach der Renaturierung und Reinigung biophysikalisch charakterisiert. So konnten mit Hilfe von verschiedenen Methoden die beiden Proteine miteinander verglichen werden. Es zeigte sich, dass beide Proteine strukturiert und als homogene Proteinlösung vorliegen. Die Untersuchung der thermischen Stabilität zeigte, dass die polyionische Variante eine geringere Stabilität aufweist als MICA. Der Hauptunterschied bestand jedoch darin, dass MICA mit steigender Temperatur aggregierte, wohingegen MICA-E<sub>8</sub>C auch bei sehr hohen Temperaturen noch in Lösung blieb. Nach der biophysikalischen Charakterisierung erfolgte die Untersuchung der Funktionalität der polyionischen MICA-Variante. Hierfür wurde die extrazelluläre Domäne des Rezeptors NKG2D renaturiert und gereinigt. Die Bindung des MICA-E<sub>8</sub>C an das Rezeptorfragment konnte mittels unterschiedlicher Methoden *in vitro* nachgewiesen werden. Diese Untersuchungen zeigten, dass die polyionische Fusion keinen Einfluss auf die Bindungseigenschaften des MICA hatte. Bei der Bindung des MICA-E<sub>8</sub>C an den Rezeptor auf NK92-Zellen konnte jedoch nicht eindeutig eine spezifische Interaktion nachgewiesen werden. Dennoch wurde im nächsten Schritt das Immunkonjugat B3-MICA hergestellt. Das polyionische Antikörperfragment B3-R<sub>8</sub>CP und der polyionische Immunligand MICA-E<sub>8</sub>C konnten aufgrund der entgegengesetzt geladenen Fusionspeptide über elektrostatische Wechselwirkungen miteinander interagieren. Für die kovalente Verknüpfung der Proteine sorgten die zusätzlich in die Fusionspeptide eingefügten Cysteine, welche unter geeigneten Bedingungen eine Disulfidbrücke ausbilden, woraus das bifunktionelle Immunkonjugat B3-MICA resultierte. An die Reinigung des B3-MICA schloss sich die Untersuchung der biologischen Aktivität in Zellkultur an. Dabei zeigte sich, überraschenderweise, dass B3-MICA *per se* eine zytotoxische Wirkung auf Lewis Y-positive Zellen hatte, d.h. als Immuntoxin fungierte. Die Untersuchung der Zytotoxizität wurde mit Lewis Y-positiven Zelllinien, die das Antigen internalisieren bzw. nicht internalisieren, wiederholt. Dadurch konnte die zytotoxische Wirkung letztlich auf die Internalisierung des Antigens Lewis Y und damit die Aufnahme des gebundenen B3-MICA in die Zellen zurückgeführt werden. Bei Lewis Y-negativen Zellen konnte kein zytotoxischer Effekt beobachtet werden. Da jedoch keinerlei Effekt des B3-MICA bei simultaner Inkubation mit NK-Zellen beobachtet werden konnte, wurden die NK92-Zellen bezüglich ihrer Aktivität und Zytotoxizität untersucht. Es zeigte sich, dass die Zelllinie K-562, wie erwartet, sehr sensitiv auf die NK-Zellen reagierte und lysiert wurde. Auch gegenüber MCF7-Zellen zeigte NK92 eine zytotoxische Aktivität.

Somit bleibt festzuhalten, dass mit dem Immunkonjugat B3-MICA ein wirksames Immuntoxin geschaffen werden konnte, das Konjugat jedoch nicht in der Lage war, NK-Zellen zu rekrutieren und simultan zu aktivieren.

---

## 4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei artifizielle bifunktionelle Immunkonjugate entwickelt und funktionell charakterisiert. Die modularen Proteinkomplexe bestanden aus einem zellbindenden Antikörperfragment (B3-R<sub>8</sub>CP) und je einem funktionellen Protein; einem Proteintoxin (E<sub>8</sub>C-LLO) und einem Immunliganden (MICA-E<sub>8</sub>C). Im Kontext der Entwicklung potenziell in der Krebstherapie einsetzbarer bispezifischer Proteinkonstrukte sollten zwei unterschiedliche Strategien verfolgt werden. Das Proteintoxin E<sub>8</sub>C-LLO wirkte unmittelbar zytotoxisch auf Zellen, wohingegen durch den Immunliganden MICA-E<sub>8</sub>C die simultane Bindung und Aktivierung Natürlicher Killerzellen vermittelt werden sollte. Beide Proteine sollten durch das gekoppelte tumorspezifische Antikörperfragment gezielt an Tumorzellen adressiert werden, was letztlich zur Protein-vermittelten bzw. Zell-vermittelten Lyse der Tumorzellen führen sollte. Die Verknüpfung der Komponenten zu einem bifunktionellen Proteinkonstrukt wurde mittels eines hoch spezifischen Heterodimerisierungsmotives gewährleistet. Nach der Herstellung und Charakterisierung der Proteinkonstrukte wurde ihre biologische Aktivität in Zellkulturexperimenten untersucht.

### 4.1 Das Immuntoxin B3-LLO

Krebserkrankungen stellen noch immer eines der häufigsten Leiden weltweit dar und stehen in Deutschland an zweiter Stelle hinter Herz-Kreislauf-Erkrankungen als Todesursache (Quelle: Bundesamt für Statistik, Stand 2008). Aus diesem Grund wird intensiv an neuen therapeutischen Ansätzen geforscht, welche die Konflikte der bisherigen versuchen zu umgehen. Denn letztlich sollte die Therapie so aggressiv wie möglich sein, um alle Tumorzellen zu zerstören und dabei möglichst wenige Nebenwirkungen aufzuweisen. Ein viel versprechender Ansatz ist die Verwendung monoklonaler Antikörper in der Krebstherapie, von denen bisher bereits einige für die Behandlung verschiedener Krebsarten zugelassen sind (Weiner *et al.*, 2010). Da jedoch nicht alle Patienten gleichermaßen darauf ansprechen, ist die Verbesserung der Wirksamkeit ein wichtiger Aspekt in der Entwicklung effizienterer therapeutischer Antikörper. Eine Möglichkeit, um die Wirksamkeit zu steigern, ist die Fusion der Antikörper mit zytotoxischen Komponenten. Die bisher verwendeten zytotoxischen Komponenten in solchen Immunkonjugaten reichen von chemotherapeutisch eingesetzten Agenzien wie Antifolaten (Shen *et al.*, 1986), Anthracyclinen (Dillman *et al.*, 1988), Radionukliden (Press *et al.*, 1995; Kaminski *et al.*, 1996), kleinen toxischen Molekülen wie Calicheamicin (Sievers *et al.*, 1999) bis hin zu Proteintoxinen (Brinkmann *et al.*, 2001; Kreitman, 2006). Die zytotoxische Wirkung der Immuntoxine hängt von verschiedenen Faktoren, wie der Menge an präsentiertem Antigen auf der Zelloberfläche, der Bindungsaffinität des Antikörpers, der Internalisierungsrate sowie der intrazellulären Prozessierung ab (Hexham *et al.*, 2001). Für die therapeutische Nutzung toxischer Proteine müssen diese häufig modifiziert werden; so müssen die Zellbindungsdomänen für *targets* auf normalen Zellen entfernt werden (Frankel *et al.*, 2000) oder die Proteine müssen deglykosyliert werden, um einer schnellen Beseitigung durch Leberzellen, welche Mannoserezeptoren exprimieren, zu entgehen (Thorpe *et al.*, 1988). Die momentan genutzten toxischen Proteine in Immuntoxinen, die sich in klinischen Testphasen befinden, sind das *Pseudo-*

*monas* Exotoxin, Gelonin, Bouganin, *Diphtherie* Toxin und RNase (Schrama *et al.*, 2006; Cizeau *et al.*, 2009). Somit bleibt die Suche nach neuen Toxinen weiterhin ein Ziel der Forschung.

In dieser Arbeit wurde das bakterielle Toxin Listeriolysin O (LLO) als zytotoxische Komponente in einem Immuntoxin eingesetzt. Es besitzt viele Charakteristiken, die es als toxische Komponente in einem Immuntoxin interessant macht. So muss es nicht modifiziert werden und besitzt einzigartige Eigenschaften, wie die Möglichkeit der Regulation der zytolytischen Aktivität durch die Oxidation des singulären Cysteins oder das saure pH-Optimum der Aktivität (Geoffroy *et al.*, 1987; Giammarini *et al.*, 2003; Glomski *et al.*, 2002). Da es sich um ein porenbildendes Protein handelt, stellen auch der intrazelluläre Transport sowie die Freisetzung aus Endosomen kein Hindernis dar. Das intrinsische Cystein des LLO stellt nicht nur einen idealen Ort für Konjugationen und chemische Modifikationen dar (Saito *et al.*, 2003), es dient auch der Regulation der hämolytischen Aktivität des Proteins.

Durch die Kopplung des LLO an das tumorspezifische Antikörperfragment B3-R<sub>8</sub>CP sollte eine Zelltyp-spezifische Adressierung an Tumorzellen gewährleistet werden. Das Antikörperfragment kam bereits im Kontext verschiedener Immuntoxine zum Einsatz (Brinkmann *et al.*, 1993; Reiter *et al.*, 1994; Pastan *et al.*, 1995) und befindet sich derzeit mit den *Pseudomonas* Exotoxin-basierten Immuntoxinen LMB-7 und LMB-9 in klinischen Tests (Pastan *et al.*, 2007). Die polyionische Fusion R<sub>8</sub>CP der V<sub>H</sub>-Domäne des Antikörperfragmentes hat dabei keinen Einfluss auf die Antigen-Bindung (Stubenrauch *et al.*, 2001; May *et al.*, 2002). Durch die Kopplung der beiden Komponenten B3-R<sub>8</sub>CP und des polyionischen E<sub>8</sub>C-LLO musste gewährleistet sein, dass ein ausreichend stabiles Konstrukt entsteht und, bedingt durch die Konjugation der Komponenten, kein irreversibler Aktivitätsverlust der beiden Proteine auftreten konnte. Die Kopplung der beiden Proteine erfolgte mittels der bereits etablierten Methode eines hoch spezifischen Heterodimerisierungsmotives (Richter *et al.*, 2001). Dabei assoziieren die entgegengesetzt geladenen polyionischen Fusionspeptide E<sub>8</sub>C und R<sub>8</sub>CP der Proteine über elektrostatische Wechselwirkungen miteinander. Durch zusätzlich in die polyionischen Fusionen eingefügte Cysteine wird die kovalente Verknüpfung der beiden Proteine zu einem stabilen Proteinkonstrukt gewährleistet. In dieser Arbeit wurde die kovalente Verknüpfung der Proteine über eine Disulfidbrücke in Gegenwart von Luftsauerstoff durch die Zugabe von Cu<sup>2+</sup>-Ionen katalysiert. Nach der Optimierung der pH-Bedingungen und eingesetzten NaCl-Konzentrationen konnten auf diese Weise etwa 80 % Produktausbeute (B3-LLO) nach der Kopplung erhalten werden, was vergleichbar mit Daten aus der Literatur ist (Kleinschmidt *et al.*, 2003). Die Vorteile der polyionischen Fusionen als Kopplungsmodule gegenüber der chemischen oder genetischen Fusion sind vielfältig. So können die zu koppelnden Komponenten einfach ausgetauscht werden und ermöglichen damit ein effizientes *screening* nach geeigneten Bindemolekülen oder toxischen Proteinen. Weiterhin können die einzelnen polyionischen Proteine meist in größeren Ausbeuten gewonnen werden als ein genetisch fusioniertes Konstrukt. So können die angefügten Fusionspeptide auch die Reinigung der Proteine, z. B. über Ionenaustauschchromatographie, wesentlich erleichtern. Genetisch fusionierte Konstrukte müssen entweder renaturiert oder über periplasmatische Sekretion in Bakterien bzw. durch Expression in eukaryontischen Zellen hergestellt werden, was wiederum kostenintensiv ist. Der Vorteil gegenüber der chemischen Verknüpfung, beispielsweise über *crosslinker* mit funktionellen Gruppen, liegt in der Homogenität des Produktes. Chemische Verknüpfungen führen oft zu heterogenen Produkten. Daher wurde die Methode der Kopplung über polyionische Fusionspeptide als hoch spezifischem Dimerisierungsmotiv bereits bei der Entwicklung eines Immuntoxins (Kleinschmidt *et al.*, 2003;

Kurschus *et al.*, 2004) und zur Modifizierung virusanaloger Partikel mit Antikörperfragmenten (Stubenrauch *et al.*, 2001; May *et al.*, 2002) erfolgreich eingesetzt.

Es ist bekannt, dass LLO die Fähigkeit zur Hämolyse, also zur Zerstörung der Membran nativer Erythrozyten besitzt (Jenkins *et al.*, 1964; Geoffroy *et al.*, 1987). Die polyionische Fusion E<sub>8</sub>C am N-Terminus des LLO beeinflusste nicht die biologische Aktivität des Proteins, wie durch Hämolyseexperimente im Vergleich mit dem Wildtyp-LLO gezeigt werden konnte. Die hämolytische Aktivität des LLO unter neutralen und sauren Bedingungen wurde u. a. von Geoffroy *et al.* (1987) untersucht. Dabei konnte keinerlei hämolytische Aktivität des LLO unter neutralen Bedingungen festgestellt werden, jedoch eine hohe Aktivität unter sauren Bedingungen. Diese Studie steht damit im Widerspruch zu einer Studie von Giammarini *et al.* (2003, 2004), die durchaus Aktivität unter neutralen Bedingungen beobachteten. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte die hämolytische Aktivität der LLO-Varianten unter neutralen Bedingungen gezeigt werden. Die Aktivität war jedoch geringer als unter sauren Bedingungen. Der Vergleich des EC<sub>50</sub>-Wertes von LLO unter sauren Bedingungen ( $7 \pm 0.3$  pM) zu dem von Geoffroy *et al.* (1987) bestimmten Wert von 1 ng/mL (ca. 20 pM) zeigt eine gute Übereinstimmung. Die Oxidation der Thiolgruppe des singulären Cysteins des LLO führt hingegen zu einem dramatischen Verlust an hämolytischer Aktivität des Proteins, die jedoch durch Reduktion vollständig reversiert werden kann (Geoffroy *et al.*, 1987; Billington *et al.*, 2000; Giammarini *et al.*, 2003). In dieser Arbeit konnte durch die Oxidation des Cysteins eine Reduktion der Aktivität um ca. Faktor 1000 erreicht werden und steht damit in Einklang zu den von Günther (2005) gewonnenen Daten. Diese Eigenschaft der Reduktion der hämolytischen Aktivität konnte sowohl bei E<sub>8</sub>C-LLO als auch bei dem Immuntoxin B3-LLO erzielt werden. Die Möglichkeit, die Aktivität des LLO durch die Oxidation des Cysteins zu regulieren, machte es damit zu einer interessanten zytotoxischen Komponente.

Die Zelltyp-spezifische Adressierung des Immuntoxins B3-LLO wurde, wie bereits erwähnt, durch das tumorspezifische Antikörperfragment B3-R<sub>8</sub>CP vermittelt. Innerhalb des Immuntoxins lag das singuläre Cystein des E<sub>8</sub>C-LLO oxidiert vor, so dass es nur eine geringe Aktivität besaß. Dies spiegelte sich in der geringen Zelltyp-unspezifischen Toxizität des B3-LLO gegenüber den Lewis Y-negativen Zelllinien HT-29 und HeLa wider. Für Lewis Y-positive Zellen hingegen war die Situation aufgrund der Zelltyp-spezifischen Adressierung des B3-LLO anders. Nach der Bindung des Antikörperfragmentes an das Antigen Lewis Y auf Tumorzellen erfolgt die Internalisierung des Proteins über rezeptorvermittelte Endozytose (Goldstein *et al.*, 1979). Dieser Prozess vollzieht sich innerhalb 1 h (Rosenblum *et al.*, 2003) und konnte speziell für die Zelllinie MCF7 und ihr Antigen Lewis Y gezeigt werden (Frost, 2009). So gut wie jedes Immuntoxin wird durch rezeptorvermittelte Endozytose in die Zelle aufgenommen und durchläuft im Anschluss die endosomale bzw. lysosomale Degradation (Oeltmann & Frankel, 1991; Garnett, 2001). Die Aktivität des E<sub>8</sub>C-LLO wird vermutlich durch die intrazelluläre Reduktion des B3-LLO wieder erlangt. Die Reduktion von Disulfidbindungen solcher Immunkonjugate kann dabei in endosomalen/lysosomalen Kompartimenten bzw. dem Zytoplasma der Zelle stattfinden (Feener *et al.*, 1990; Saito *et al.*, 2003). Zudem ist die Reduktion von Disulfidbindungen in Endosomen bzw. dem *trans*-Golgi-Netzwerk ein bekannter Mechanismus für die Aktivierung bakterieller Toxine, wie dem *Diphtherie* Toxin oder dem Cholera-toxin. Dieses Konzept der intrazellulären Reduktion wurde in dieser Arbeit im Kontext des artifiziellen Immuntoxins B3-LLO genutzt. Die intrazelluläre Reduktion des B3-LLO und Aktivierung des E<sub>8</sub>C-LLO führte dabei zu

einem geringeren EC<sub>50</sub>-Wert für die Lewis Y-positiven Zelllinien im Vergleich zu den Lewis Y-negativen Zelllinien. So konnte eine Zelltyp-spezifische Toxizität des Immuntoxins von  $2.3 \pm 0.5$  nM für MCF7 und  $12.7 \pm 1.94$  nM für SKBR-3 ermittelt werden. Der Unterschied in den EC<sub>50</sub>-Werten der beiden Zelllinien könnte auf das unterschiedliche Expressionslevel des Antigens Lewis Y zurückzuführen sein. Im Vergleich zu B3-LLO konnte reduziertes E<sub>8</sub>C-LLO sämtliche Zelllinien in gleicher effizienter Weise töten, was in nahezu identischen EC<sub>50</sub>-Werten resultierte. Der Vergleich der EC<sub>50</sub>-Werte zwischen Zelltyp-unspezifisch wirkendem reduziertem E<sub>8</sub>C-LLO und dem Zelltyp-spezifischen B3-LLO bei MCF7 und SKBR-3 zeigte jedoch ebenfalls nahezu identische EC<sub>50</sub>-Werte. Dies war insofern überraschend, als dass B3-LLO und E<sub>8</sub>C-LLO vermutlich über unterschiedliche Mechanismen toxisch auf die Zelle wirken. So ist es denkbar, dass reduziertes LLO im Kontext eines *cholesterol-dependent pore-forming cytolysin* (Bhakdi *et al.*, 1985; Bayley, 1997; Tweten, 2005) an die Zellmembran bindet, was zur Bildung von Poren in der Zellmembran und damit letztlich zur Zellyse führt. Im Gegensatz dazu wird das Immuntoxin B3-LLO internalisiert und entwickelt intrazellulär seinen zytotoxischen Effekt. Die intrazelluläre Reduktion des B3-LLO und die Lokalisation in sauren Vesikeln (Endosomen/Lysosomen) führen dazu, dass LLO die maximale Aktivität entfalten kann. Somit wäre es durchaus vorstellbar, dass LLO im Kontext seiner natürlichen Funktion, der Freisetzung von *Listeria monocytogenes* aus Phagosomen (Cossart & Lecuit, 1998), die strukturelle Integrität der endosomalen/lysosomalen Kompartimente zerstört. Da lysosomale Cathepsine mit der Aktivierung von Caspasen und damit der Induktion der Apoptose in Verbindung gebracht wurden (Roberg *et al.*, 1999; Bursch, 2001), könnte die Freisetzung lysosomaler Proteine und Enzyme in das Zytoplasma der Zelle zum Zelltod führen (Bursch, 2001). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Infektion muriner dendritischer Zellen (Guzman *et al.*, 1996) oder auch Hepatozyten (Rogers *et al.*, 1996) mit *Listeria* zur Apoptose der Zellen führte. Die wohl interessanteste Studie in diesem Zusammenhang stammt von Carrero *et al.* (2004). Hier konnte gezeigt werden, dass rekombinant gewonnenes LLO in sublytischen Konzentrationen die Apoptose von Lymphozyten einleiten konnte. Die genannten Beispiele zeigen jedoch lediglich, dass durch *Listeria* bzw. LLO die Apoptose von Zellen induziert werden kann.

Das Immuntoxin B3-LLO wirkt nach der Aufnahme in Zellen intrazellulär. Alternativ zur Freisetzung lysosomaler Proteasen wäre auch eine toxische Aktivität des LLO denkbar, bei dem das Protein nach der Freisetzung aus den Endosomen/Lysosomen intrazellulär an Zellmembranen bindet, was zur Porenbildung und dadurch zum Zelltod führen würde. Gegen diese Vermutung spricht jedoch, dass die Aktivität des LLO bei neutralen pH-Werten (Zytoplasma ca. pH 7.2) gegenüber der Aktivität bei sauren pH-Werten um das 10-fache reduziert ist (Glomski *et al.*, 2002) bzw. inhibiert ist (Geoffroy *et al.*, 1987). Auch in der vorliegenden Arbeit war die Aktivität des LLO bei Hämolyseexperimenten unter neutralen Bedingungen geringer als unter sauren. Diese Eigenschaften des LLO sowie das Vorhandensein einer PEST-Sequenz im N-terminalen Bereich führen vermutlich zur teilweisen Inaktivierung bzw. dem raschen proteolytischen Abbau des Proteins im Zytoplasma (Decatur & Portnoy, 2000; Lety *et al.*, 2001). Wie bereits erwähnt, vermittelt LLO in seiner natürlichen Funktion die Freisetzung von *Listeria* aus den Phagosomen, wobei jedoch keine Toxizität von LLO auf den Wirtsorganismus ausgeht (Decatur & Portnoy, 2000). Für modifizierte *L. monocytogenes*, die Perfringolysin O statt LLO exprimierten, konnte hingegen gezeigt werden, dass nach der Freisetzung der Bakterien aus den Vakuolen Perfringolysin O die Plasmamembran lysierte und die Wirtszellen

tötete (Jones & Portnoy, 1994). Somit ist es naheliegender, dass durch LLO die Endosomen bzw. Lysosomen zerstört werden, was letztlich zum Zelltod führt. Welcher Mechanismus auch immer letztlich zum Zelltod führt; es soll an dieser Stelle noch einmal auf die Eigenschaften des LLO aufmerksam gemacht werden, die es zu einer sehr interessanten toxischen Komponente machen. Die intrazelluläre Reduktion des Immuntoxins und Lokalisation in sauren Kompartimenten bieten optimale Bedingungen für die Entfaltung der vollen Aktivität des LLO. Damit besitzt es entscheidende Vorteile gegenüber vielen anderen Toxinen, welche die endosomale/lysosomale Barriere meist nicht überwinden können und in den sauren Kompartimenten proteolytisch degradiert werden. Bei diesen Immuntoxinen müssen oft mehrere Millionen Moleküle/Zelle aufgenommen werden, um die Freisetzung einer ausreichenden Anzahl an toxischen Molekülen aus den Endosomen/Lysosomen und damit den Zelltod zu gewährleisten.

Oxidiertes LLO zeigte, wie erwartet, eine geringe Zelltyp-unspezifische Toxizität gegenüber sämtlichen Zellen im Vergleich zum reduzierten Toxin. So zeigte auch B3-LLO für die Lewis Y-negativen Zelllinien eine ähnliche Zelltyp-unspezifische Toxizität wie oxidiertes LLO. Der Unterschied in der Zytotoxizität zwischen reduziertem und oxidiertem LLO war jedoch nicht so groß wie bei den Hämolyseexperimenten. In einer früheren Arbeit konnte gezeigt werden, dass thiolmodifiziertes LLO noch an der Membranbindung beteiligt sein kann (Günther, 2005). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte die Bindung von oxidiertem LLO an Zellen fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden. Des Weiteren haben Untersuchungen an Streptolysin O (Pinkney *et al.*, 1989) bzw. LLO (Michel *et al.*, 1990; Stachowiak *et al.*, 2009) gezeigt, dass das Vorhandensein des intrinsischen Cysteins nicht essenziell für die Aktivität der Proteine ist. Dies würde bedeuten, dass LLO trotz Thiolmodifizierung eine, wenn auch eingeschränkte, lytische Aktivität aufweist und somit keine vollständige Inhibierung der Aktivität erreicht werden kann. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass LLO im Kontext des Immuntoxins B3-LLO nicht Zelltyp-unspezifisch mit Zellmembranen interagiert. Möglicherweise verhindern sterische Effekte aufgrund der Größe des bifunktionellen Konstruktes die Membranbindung und Oligomerisierung des LLO. Weiterhin wäre es denkbar, dass ein Teil des oxidierten LLO an der Zelloberfläche reduziert und somit aktiviert wird. Im Serum finden sich typischerweise leicht reduzierende Bedingungen mit einem Glutathionspiegel im tiefen mikromolaren Bereich (Saito *et al.*, 2003), die zur Reduktion des oxidierten LLO und damit zur Aktivierung des Proteins führen könnten. Frost (2009) konnte zeigen, dass durch humane Zellen sezerniertes Glutathion zur Dissoziation eines disulfidstabilisierten, polyionischen Fusionsproteins innerhalb mehrerer Stunden führte. Für das Immuntoxin B3-LLO konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit eine ausreichende Stabilität gegenüber proteolytischer Degradation und Reduktion in fötalem Kälberserum über Stunden hinweg gezeigt werden, so dass diese Effekte vermutlich lediglich eine untergeordnete Rolle spielen.

Überraschenderweise liegen die  $EC_{50}$ -Werte der Zellkulturexperimente etwa drei Größenordnungen über denen der Hämolyseexperimente. Dies könnte u. a. darin begründet liegen, dass sich nach den Hämolyseexperimenten unmittelbar im Anschluss an das Experiment Aussagen über die Anteile der intakten bzw. lysierten Erythrozyten treffen lassen. In den Zellkulturexperimenten hingegen können die Zellen, die bei einer bestimmten Toxinkonzentration überleben aufgrund der 48stündigen Inkubationszeit weitere Zellzyklen durchlaufen. Die Anteile lebender und toter Zellen sind demnach u. a. von der Teilungsrate der Zellen abhängig. Des Weiteren sind Erythrozyten aufgrund dessen, dass

ihnen Zellorganellen, Zellkern und die Fähigkeit zur Endozytose fehlen, ein recht einfaches Modell eukaryontischer Zellen. Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber dem Zytolysin LLO sind im Vergleich zu den komplexeren Krebszellen also durchaus zu erwarten. Weiterhin wäre es denkbar, dass es Unterschiede in der Membranzusammensetzung zwischen Erythrozyten und Krebszellen, besonders im Hinblick auf den Cholesteringehalt, gibt. Da LLO, wie fast alle *cholesterol-dependent pore-forming cytolysins*, für die Membraninteraktion und für die zytolytische Aktivität Cholesterin benötigt (Heuck *et al.*, 2007; Flanagan *et al.*, 2009), könnte es durchaus einen Unterschied in der Empfindlichkeit der Erythrozyten gegenüber dem Zytolysin LLO im Vergleich zu Krebszellen geben. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass lebende Zellen in der Lage sind, eine beschränkte Anzahl an Poren in der Membran zu reparieren (Jacobs *et al.*, 1998). Dies könnte ebenfalls einen Grund für die Unterschiede in der hämolytischen und zytotoxischen Aktivität des LLO darstellen.

In Tabelle 4.1 sind die  $EC_{50}$ -Werte einiger Immuntoxine aufgeführt. Es wird deutlich, dass die  $EC_{50}$ -Werte vieler Immuntoxine zum Teil im unteren pikomolaren Bereich liegen. Für das *Pseudomonas* Exotoxin (PE) wird angenommen, dass ein einzelnes Molekül ausreichend ist, um eine Zelle zu töten. Darauf beruht u. a. die hohe Wirksamkeit der meisten Immuntoxine. PE38, eine trunkierte Variante des Exotoxin, inaktiviert nach der Aufnahme in die Zelle die Proteinbiosynthese, was direkt zum Zelltod führen oder aber die Apoptose induzieren kann (Hafkemeyer *et al.*, 1999).

Tabelle 4.1:  $EC_{50}$ -Werte einiger Immuntoxine, welche durch Zellkulturexperimente mit humanen Zelllinien ermittelt wurden.

Immuntoxin	Zelllinie	$EC_{50}$ (pM)	Referenz
1G10-Saporin	Raji	3	Bolognesi <i>et al.</i> (2000)
B3-PE38	MCF7	$1.7 \cdot 10^3$	Kleinschmidt <i>et al.</i> (2003)
	SKBR-3	$42 \cdot 10^3$	Kurschus <i>et al.</i> (2004)
8H9-PE38	MCF7	80	Onda <i>et al.</i> (2004)
hIL-2-Luffin P1	T-Zellen	$1.8 \cdot 10^3 - 10 \cdot 10^3$	Wang <i>et al.</i> (2010)
MEL sFv-rGel	A-375	$8 \cdot 10^3$	Rosenblum <i>et al.</i> (2003)
hS83P34	Raji	$850 \cdot 10^3$	Wan <i>et al.</i> (2006)
D7-PE40	C4-2	140	Wolf <i>et al.</i> (2010)

Die Toxizität des B3-LLO im nanomolaren Bereich ist durchaus vergleichbar mit einigen in Tabelle 4.1 aufgeführten Immuntoxinen bzw. zeigt B3-LLO sogar eine bessere Effizienz bei der Eliminierung von Krebszellen. So ist die Toxizität des Immuntoxins B3-LLO mit einem  $EC_{50}$ -Wert von  $2.3 \pm 0.5$  nM für MCF7 und  $12.7 \pm 1.94$  nM für SKBR-3 auch durchaus vergleichbar mit den  $EC_{50}$ -Werten anderer Immuntoxine, die ebenfalls auf dem Antikörper B3 als zellbindender Komponente basieren (Reiter *et al.*, 1994; Kleinschmidt *et al.*, 2003). Eine Möglichkeit, die Wirksamkeit des Immuntoxins noch weiter zu steigern, könnte ein verbessertes *targeting* zu den Zielzellen darstellen. Da das Fv-Fragment des B3-Antikörpers lediglich eine mikromolare Affinität zu seinem Antigen aufweist, könnte das *targeting* und damit die Effizienz des LLO-basierten Immuntoxins vermutlich durch die Kopplung an ein affineres tumorspezifisches Antikörperfragment weiter gesteigert werden.

## 4.2 Das Immunkonjugat B3-MICA

Neben Immuntoxinen, die viel versprechende Ansätze für die Krebstherapie liefern und von denen sich einige in klinischen Testphasen befinden, gibt es in der molekularen Krebstherapie noch die Strategie der Aktivierung des Immunsystems. Beide Ansätze nutzen tumorspezifische Antikörper für die Adressierung von Krebszellen. Während Immuntoxine jedoch über die gekoppelte toxische Komponente die direkte Zytotoxizität auf Zielzellen vermitteln, zielen Immunkonjugate auf die Rekrutierung und Aktivierung von Effektorzellen des Immunsystems. Diese Effektorzellen vermitteln nach der Erkennung der Zielzelle die Zellyse. Bei den ersten bifunktionellen Konjugaten handelte es sich um bispezifische Antikörper, die simultan T-Zell-Rezeptoren und ein tumorspezifisches *target* auf Zielzellen binden konnten (Staerz *et al.*, 1985) und dadurch zytotoxische T-Zellen für die Lyse von Krebszellen nutzten. Seitdem sind viele Konstrukte entwickelt worden, die ebenso viel versprechende Ansätze in der Krebstherapie liefern. Vermutlich werden die größten Erfolge in der Behandlung von Krebs nicht durch eine einzelne Strategie erzielt werden können, sondern durch eine Kombination mehrerer Strategien, wie z. B. dem Einsatz von Immuntoxinen in Kombination mit der Aktivierung des Immunsystems.

In dieser Arbeit kam der Immunligand MICA zum Einsatz. Die Struktur des Proteins wurde aufgeklärt (Li *et al.*, 1999), die Interaktion mit dem Rezeptor ist bekannt und ebenfalls strukturell aufgeklärt (Li *et al.*, 2001) und schließlich ist gezeigt worden, dass die Bindung von MICA an den Rezeptor NKG2D auf Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) zu deren Aktivität und NK-Zell-vermittelten Lyse der Zielzellen führt (Bauer *et al.*, 1999). Aus diesen Gründen schien MICA ein geeigneter Ligand für die Rekrutierung und Aktivierung von NK-Zellen im Kontext eines Immunkonjugates zu sein. Die Vorteile der Rekrutierung Natürlicher Killerzellen im Vergleich zu anderen Immunzellen sind vielfältig. So ist eine Rekrutierung und Aktivierung gleichzeitig möglich, wohingegen T-Zellen zunächst MHC Klasse I bzw. II-gebundene Antigene über den T-Zell-Rezeptor binden müssen, um aktiviert zu werden. Zusätzlich ist die Kostimulation über den CD28-Rezeptor notwendig, damit die T-Zelle vollständig aktiviert wird (Lenschow *et al.*, 1996). Weiterhin sind NK-Zellen sehr effiziente zytotoxische Zellen, deren Aktivierung zur Sekretion von Zytokinen führt, die wiederum andere Immunzellen (dendritische Zellen, Makrophagen, T-Zellen) anlocken und aktivieren (Vivier *et al.*, 2008). Apoptotische Tumorzellen präsentieren dann Tumorantigene auf der Zelloberfläche, die wiederum dendritische Zellen anlocken können (Melero *et al.*, 2000).

### 4.2.1 Charakterisierung MICA-E<sub>8</sub>C

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl das Wildtyp-MICA als auch die polyionische Variante MICA-E<sub>8</sub>C rekombinant in *E. coli* exprimiert, renaturiert und gereinigt. Zunächst wurden die beiden MICA-Varianten vergleichend biophysikalisch analysiert. Die Analyse der Proteine mittels *reversed phase* HPLC zeigte, dass beide Proteine als homogen disulfidverbrückte Spezies vorlagen. Mittels Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie wurde nachgewiesen, dass beide Proteine gleich strukturiert sind und einen hohen Anteil an  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen aufweisen. Dieses Ergebnis steht in guter Übereinstimmung mit der aufgeklärten Struktur des MICA (Li *et al.*, 1999; 2001). Die größten Unterschiede zwischen den beiden Proteinen zeigten sich jedoch hinsichtlich der Stabilität gegenüber

thermisch induzierter Denaturierung. Während MICA konzentrationsabhängig mit steigender Temperatur aggregierte, blieb MICA-E<sub>8</sub>C nach der Denaturierung auch bei hohen Temperaturen stets in Lösung. Die naheliegendste Erklärung hierfür liefert die polyionische Fusion E<sub>8</sub>C, die durch die zusätzlichen Ladungen die höhere Löslichkeit des Proteins MICA-E<sub>8</sub>C vermittelt. Obwohl MICA eine stärkere Aggregation als MICA-E<sub>8</sub>C zeigt, weist es bei niedrigen Proteinkonzentrationen eine höhere Stabilität (strukturelle Änderungen ab 42 °C) als MICA-E<sub>8</sub>C (33 °C) auf. Es wäre also durchaus möglich, dass die polyionische Fusion zu einer verminderten Stabilität des Proteins führt, obwohl die angefügte polyionische Fusion die strukturelle Integrität des Proteins nicht zu beeinflussen scheint, wie die CD-Spektren vermuten lassen. Für andere polyionische Fusionsproteine konnte eine Destabilisierung des Proteins im Vergleich zum Wildtyp-Protein durch die polyionische Fusion nicht beobachtet werden (Günther, 2005). Das CD-Signal zeigte eine Mehrphasigkeit der Entfaltung des MICA-E<sub>8</sub>C. Es blieb jedoch ungeklärt, welche Bereiche des Proteins zunächst strukturellen Änderungen unterlagen bei der thermisch induzierten Entfaltung. So wäre es möglich, dass der Bereich der Rezeptorinteraktion zunächst unbeeinflusst bleibt und erst bei höheren Temperaturen entfaltet. Zusammenfassend muss jedoch festgehalten werden, dass MICA-E<sub>8</sub>C eine relativ geringe Stabilität gegenüber thermisch induzierter Denaturierung aufweist, was den Einsatz in der Zellkultur bei 37 °C erschweren könnte. Dem gegenüber kann Wildtyp-MICA auch bei 37 °C an den Rezeptor binden (Li *et al.*, 2001).

Nach diesen biophysikalischen Analysen wurde die Funktionalität des polyionischen MICA, die extrazelluläre Domäne des NK-Zell-Rezeptors NKG2D *in vitro* zu binden, untersucht. Sowohl mittels analytischer Gelfiltration als auch analytischer Ultrazentrifugation konnte eine Komplexbildung zwischen Ligand und Rezeptor nachgewiesen werden. Dies steht in Einklang mit dem Nachweis der Bindung zwischen rekombinant gewonnenem MICA und NKG2D durch Li *et al.* (2001). Diese Ergebnisse implizieren eine native Struktur des MICA-E<sub>8</sub>C. Weiterhin wird deutlich, dass die polyionische Fusion keinen Einfluss auf die Funktionalität des Proteins hat, was bereits für andere polyionische Proteine nachgewiesen wurde (Stubenrauch *et al.*, 2001; May *et al.*, 2002; Kleinschmidt *et al.*, 2003; Günther, 2005). Da gezeigt wurde, dass NKG2D-Homodimere mit monomerem MICA stabile Komplexe in Lösung bilden (Steinle *et al.*, 2001), wäre es denkbar, dass, sofern die Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor einmal stattgefunden hat, MICA durch die Bindung stabilisiert wird. Eine dementsprechend durchgeführte analytische Ultrazentrifugation, bei der die Komplexbildung bei 20 °C gewährleistet wurde, zeigte, dass nach der Erhöhung der Temperatur auf 37 °C noch eine Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor stattfand (Daten nicht gezeigt). So wurde für die Interaktion von MICA mit dem Rezeptor eine Gleichgewichts-Dissoziationskonstante von 1 µM bei 37 °C bestimmt (Li *et al.*, 2001). Die spezifische Bindung des MICA-E<sub>8</sub>C an den Rezeptor NKG2D auf Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht eindeutig nachgewiesen werden. So lieferten auch sämtliche durchgeführte Konkurrenzexperimente bzw. Experimente, bei denen die NK-Zellen mit einem anti-NKG2D-Antikörper vorinkubiert wurden um die Bindung des MICA-E<sub>8</sub>C zu blockieren, keine eindeutige Aussage. Bauer *et al.* (1999) zeigten jedoch, dass rekombinant in Insektenzellen gewonnenes (und damit glykosyliertes) biotinyliertes MICA an NK-Zellen binden konnte. Eine mögliche Ursache für diese Bindung könnte demnach die Glykosylierung des Proteins darstellen, die für die Bindung an den Rezeptor zwar nicht notwendig ist, sie jedoch verstärkt (Steinle *et al.*, 2001). Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die *in vitro*

Interaktion des MICA-E<sub>8</sub>C mit der extrazellulären Domäne des Rezeptors NKG2D nachgewiesen werden konnte. Trotz der geringen Stabilität des MICA-E<sub>8</sub>C gegenüber thermisch induzierter Denaturierung kam das Protein in Zellkulturexperimenten zum Einsatz, da die Möglichkeit bestand, dass durch die Interaktion des Rezeptors mit dem Liganden die Bindung stabilisiert wird und das Protein somit Temperaturen von 37 °C stand hält.

### 4.2.2 Kopplung von B3-MICA

Das artifizielle Immunkonjugat B3-MICA sollte im Kontext dieser Arbeit die simultane Bindung von Krebszellen und Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) vermitteln. Als Modul für die Zelladressierung des Antigens Lewis Y auf Tumorzellen wurde das tumorspezifische Antikörperfragment B3-R<sub>8</sub>CP (Pastan *et al.*, 1991) eingesetzt. Die Bindung der NK-Zellen über den aktivierenden Rezeptor NKG2D wurde durch den Immunliganden MICA-E<sub>8</sub>C vermittelt. Die Bindung des Rezeptors sollte nicht nur zur Rekrutierung der NK-Zellen sondern auch zu deren gleichzeitiger Aktivierung führen. Die Kopplung der Proteine B3-R<sub>8</sub>CP und MICA-E<sub>8</sub>C erfolgte über die polyionischen Fusionspeptide (Richter *et al.*, 2001). Diese interagieren zunächst über elektrostatische Wechselwirkungen miteinander und durch die kovalente Verknüpfung der beiden eingefügten Cysteine werden die Proteine zu einem bifunktionellen Konstrukt fusioniert. Die Kopplungsreaktion erfolgte zunächst analog zu B3-LLO. Die Proteine wurden mit GSH vorreduziert und anschließend mittels Kupferkatalysierter Oxidation an Luftsauerstoff zu B3-MICA verknüpft. Da es sich sowohl bei B3-R<sub>8</sub>CP als auch MICA-E<sub>8</sub>C um disulfidverbrückte Proteine handelt, waren die Vorreduktion der Proteine und die Vorbereitung der Proteine für die Kopplung der limitierende Faktor für eine hohe Ausbeute an Produkt. Insbesondere MICA-E<sub>8</sub>C neigt zu einer raschen Di- und Oligomerisierung nach der Vorreduktion, so dass weniger monomeres Protein für die Reaktion mit B3-R<sub>8</sub>CP zur Verfügung stand. Aus diesen Gründen wurde die Kopplung der Proteine mit Hilfe eines mikromolaren Redox-*shuffling*-Systems, bestehend aus reduziertem und oxidiertem Glutathion, optimiert. Der simultane Ansatz der Proteine in äquimolaren Konzentrationen mit einem Redox-*shuffling*-System ermöglichte sowohl den Zerfall der durch die Proteinlagerung entstandenen Homodimere als auch die Oxidation der Cysteine der polyionischen Fusionspeptide zu einer Disulfidbrücke. Weiterhin wurde auf diese Weise die Bildung von Nebenprodukten wie Homodimeren oder Oligomeren stärker unterdrückt. Somit konnte nicht nur die Ausbeute an B3-MICA deutlich gesteigert, sondern auch das Maximum der Ausbeute an Kopplungsprodukt bereits nach 4 h erreicht werden. Eine kürzere Reaktionszeit führte gleichzeitig zu einer geringeren Bildung an Aggregaten. Damit stellt die Kopplung von polyionischen Proteinen mit Hilfe eines mikromolaren Redox-*shuffling*-Systems im Hinblick auf die Vorbereitung der Proben, die Reaktionszeit, die Ausbeute an Kopplungsprodukt und die gesamte Effizienz der Kopplung eine gute Alternative zur Kupfer-katalysierten Oxidation an Luftsauerstoff dar. Es zeigte sich außerdem, dass die Nutzung der polyionischen Fusionspeptide als Dimerisierungsmotiv sehr effizient ist, zu guten Ausbeuten an Heterodimer führt und somit eine inhomogene Produktbildung, wie beispielsweise beim chemischen *crosslinking*, unterdrückt.

### 4.2.3 Aktivität des B3-MICA in der Zellkultur

Das artifizielle bispezifische Konstrukt B3-MICA sollte die simultane Bindung von Tumor- und NK-Zellen vermitteln, wobei letztere nicht nur rekrutiert, sondern gleichzeitig aktiviert werden sollten (siehe Kapitel 4.2.2). Die zelladressierende Komponente des Immunkonjugates B3-MICA bindet dabei spezifisch an das Antigen Lewis Y auf der Oberfläche von Krebszellen (Pastan *et al.*, 1991). MICA hingegen vermittelt als Immunligand die Bindung an den Rezeptor NKG2D auf NK-Zellen (Bahram *et al.*, 1994; Bauer *et al.*, 1999). Zunächst wurde die Wirkung des B3-MICA, analog des Immuntoxins B3-LLO, auf Krebszellen untersucht. Überraschenderweise stellte sich dabei ein konzentrationsabhängiger zytotoxischer Effekt für die Antigen-positive Zelllinie MCF7 heraus. Da bekannt ist, dass die Zelllinie MCF7 das Antigen Lewis Y internalisiert (Frost, 2009), kann davon ausgegangen werden, dass der zytotoxische Effekt des bifunktionellen Konstruktes B3-MICA durch die Internalisierung des Antigen-Protein-Komplexes in die Zellen hervorgerufen wird. Diese Hypothese wird untermauert durch den experimentellen Befund, dass für die ebenfalls Antigen-positive, nicht internalisierende Zelllinie A431 kein zytotoxischer Effekt des B3-MICA beobachtet werden konnte. Weiterhin konnte auch für freies MICA-E<sub>8</sub>C, welches mit Zellen inkubiert wurde, keinerlei Effekt beobachtet werden. Somit stellt B3-MICA bereits unabhängig von NK-Zellen ein wirksames Immuntoxin dar. Mit einem EC<sub>50</sub>-Wert von 76 nM ist B3-MICA zwar deutlich weniger aktiv als B3-LLO (EC<sub>50</sub> von 2.3 nM für MCF7), aber die Aktivität ist z. B. vergleichbar mit dem des Immuntoxins B3-Granzym B mit einem EC<sub>50</sub>-Wert von 98 nM für Lewis Y-positive SKBR-3-Zellen (Kleinschmidt, 2004). Bei Granzym B handelt es sich um eine Protease, welche die Apoptose in Zielzellen durch Caspase-abhängige und -unabhängige Wege induziert (Barry & Bleackley, 2002; Lord *et al.*, 2003). Wie Granzym B sind die meisten anderen Proteintoxine in Immuntoxinen ebenfalls Enzyme. So inhibiert das häufig eingesetzte *Pseudomonas* Exotoxin nach der Aufnahme in die Zelle die Proteinbiosynthese, indem es Adenosindiphosphat auf den eukaryontischen Elongationsfaktor 2 überträgt. Einen sehr ähnlichen Wirkungsmechanismus besitzt das *Diphtherie* Toxin, welches ebenfalls ein Exotoxin ist. Bei Munoz *et al.* (2007) kam das Protein Nigrin b in einem Immuntoxin zum Einsatz, welches durch seine enzymatische Wirkung (Inaktivierung von Ribosomen) toxisch auf die Zelle wirkt. Ein ähnliches Prinzip verfolgen RNasen, welche die Zielzelle durch den Abbau der RNA töten (Pavlakakis & Vogelzang, 2006). Eine enzymatische Wirkung ist jedoch bei MICA nicht bekannt und äußerst unwahrscheinlich. Darüber hinaus sind keine intrazellulären Bindungspartner von MICA bekannt. Somit bleiben die molekularen Ursachen für den MICA-E<sub>8</sub>C-vermittelten Zelltod unklar.

Im nächsten Schritt wurde die Aktivität des B3-MICA im Kontext mit NK-Zellen untersucht. Die beobachteten zytotoxischen Effekte für MCF7-Zellen lassen sich dabei jedoch auf die *per se* zytotoxische Wirkung des B3-MICA zurückführen. Überraschenderweise konnte aber auch für die nicht internalisierenden Antigen-positiven A431-Zellen, die durch B3-MICA allein nicht eliminiert werden, keine NK-Zell-vermittelte Zellyse beobachtet werden. Somit muss hier konstatiert werden, dass das Konzept der gezielten NK-Zell-Rekrutierung durch das Konstrukt B3-MICA molekular nicht realisiert werden konnte. Für diese Beobachtung lassen sich vielfältige Ursachen diskutieren. Zum einen konnte nicht eindeutig eine spezifische Interaktion von MICA-E<sub>8</sub>C mit NK-Zellen nachgewiesen werden. Es wäre also durchaus denkbar, dass B3-MICA zwar an A431-Zellen, jedoch nicht, über MICA-E<sub>8</sub>C vermittelt, an NK-Zellen binden konnte. Ursache hierfür könnte die geringe thermische Stabilität von MICA-E<sub>8</sub>C sein, so dass das Protein bei 37 °C bereits teilweise entfaltet, bevor es eine

Interaktion mit dem Rezeptor eingehen kann. Versuche bei niedrigeren Temperaturen konnten nicht durchgeführt werden, da NK-Zellen dann nicht mehr aktiv waren, d. h., keine Zellen mehr lysieren konnten (Daten nicht gezeigt). Der Einsatz von Protein-stabilisierenden Agenzien wie Glycerin (Arakawa & Timasheff, 1985), Aminosäuren (Arakawa & Timasheff, 1984), Salzen und Zuckern (Carpenter *et al.*, 1992) oder Metallionen (Arnold & Zhang, 1994) lässt sich unter Zellkulturbedingungen schwierig realisieren, da diese Zusätze verschiedene toxische bzw. osmotische Effekte auf die Zellen haben. Eine weitere Ursache für die fehlende Rekrutierung von NK-Zellen durch B3-MICA könnte die Interaktion des B3-MICA mit Serumproteinen darstellen. So konnte gezeigt werden, dass B3-MICA vermutlich kovalent an Serumproteine bindet und damit möglicherweise nicht mehr für eine biologische Aktivität zur Verfügung steht. Dieser Effekt konnte für das Immuntoxin B3-LLO, selbst bei längeren Inkubationszeiten mit fötalem Kälberserum, nicht beobachtet werden. Im Falle des MICA-E<sub>8</sub>C könnte das freie Cystein, welches im C-terminalen Bereich des Proteins lokalisiert ist, für eine kovalente Bindung an Serumproteine mit freiem Cystein verantwortlich sein (Kragh-Hansen *et al.*, 2002). Da B3-LLO nach der Kopplung einer quantitativen Thioloxydation mit oxidiertem Glutathion unterzogen wurde, konnte hier kein Effekt beobachtet werden. MICA-E<sub>8</sub>C lag vor der Kopplung ebenfalls mit oxidierten Thiolgruppen vor, könnte jedoch im Zuge der Kopplung mit einem Redox-*shuffling*-System wieder zugängliche Cysteine aufweisen. Es bleibt somit letztlich schwer zu beurteilen, ob B3-MICA bei einer ausreichenden Stabilität und dem Nachweis der Bindung des MICA-E<sub>8</sub>C an NK-Zellen tatsächlich seine Funktion erfüllen und NK-Zellen rekrutieren und aktivieren würde.

Um auszuschließen, dass für die ausgebliebene biologische Aktivität des B3-MICA die NK-Zellen verantwortlich sind, wurde in diesem Zusammenhang die Aktivität der NK-Zellen untersucht. Bei der in dieser Arbeit verwendeten Interleukin-2-unabhängigen Zelllinie NK92 MI handelt es sich um eine sehr zytotoxische Zelllinie, die phänotypisch und funktionell aktivierten NK-Zellen gleicht (Gong *et al.*, 1994; Tam *et al.*, 1999; Maki *et al.*, 2001). Da diese Zellen bereits aktiv sind, benötigen sie keine weiteren Stimulanzen wie verschiedene Interleukine und Interferone (Colucci *et al.*, 2003; Becknell & Caligiuri, 2005). Eine NK-Zell-vermittelte Zelllyse -unabhängig von B3-MICA- konnte daher für die NK-sensitive Zelllinie K-562 (West *et al.*, 1977; Kornbluth *et al.*, 1985), aber auch für MCF7 nachgewiesen werden. Um die Aktivität der Natürlichen Killerzellen genauer zu quantifizieren, wurde die Expression verschiedener Chemokine und Zytokine durch die NK-Zellen analysiert. Ein wichtiges Zytokin stellt hier das Interferon  $\gamma$  dar. Für die MICA-E<sub>8</sub>C-NKG2D-Interaktion konnte IFN $\gamma$  jedoch nicht nachgewiesen werden. Die IFN $\gamma$ -Produktion der NK-Zellen, hervorgerufen durch die Bindung des NKG2D-Rezeptors, liefert jedoch keine einheitlichen Aussagen. So gibt es Hinweise, dass die Stimulation des aktivierenden Rezeptors NKG2D auf NK-Zellen zwar zur Aktivität und damit Zytotoxizität der Zellen, jedoch nicht zur Sekretion von IFN $\gamma$  führt (Billadeau *et al.*, 2003; Zompi *et al.*, 2003). Auf der anderen Seite wurde beobachtet, dass das Ansteuern eines KIR (*killer inhibitory receptor*) auf NK-Zellen zur Sekretion von IFN $\gamma$ , jedoch nicht zur Zytotoxizität führte (Rajagopalan *et al.*, 2001). Dies verdeutlicht, dass die Sekretion von IFN $\gamma$  nicht zwingend als Maß für die Aktivität der NK-Zellen dienen kann. Weiterhin muss stets berücksichtigt werden, dass es auch zwischen primären NK-Zellen und einer Zelllinie Unterschiede geben kann. Daher wurde auch die Produktion anderer Chemokine und Zytokine durch die NK-Zellen untersucht. Als Anhaltspunkt hierfür diente eine Studie von Fauriat *et al.* (2010), die untersuchte, welche Chemokine bzw. Zytokine bei der Interaktion des

Liganden ULBP1 mit seinem Rezeptor NKG2D sezerniert werden. Es konnte hier jedoch für die Zelllinie NK92 MI kein Unterschied zwischen der basalen Expression und der K-562-vermittelten bzw. MICA-E<sub>8</sub>C-vermittelten Expression diverser Zyto- und Chemokine beobachtet werden. Es ist demnach wahrscheinlich, dass die verwendeten NK-Zellen nicht über die MICA-E<sub>8</sub>C-Bindung aktiviert werden können, weil sie bereits als aktivierte Zellen vorliegen. Bauer *et al.* (1999) konnten zeigen, dass die Bindung des NKG2D-Rezeptors durch MICA die NK-Zell-vermittelte Zelllyse durch die Zelllinie NKL (Robertson *et al.*, 1996) induzierte. Prinzipiell sollten demnach nicht nur primäre NK-Zellen sondern auch Zelllinien zur Zelllyse von Tumorzellen durch die MICA-NKG2D-Bindung in der Lage sein. Für NK92 MI konnte in dieser Arbeit zwar eine zytotoxische Aktivität gegenüber verschiedenen Zelllinien nachgewiesen werden, jedoch keine MICA-E<sub>8</sub>C-vermittelte Aktivierung. Die wohl interessantesten Veröffentlichungen in diesem Zusammenhang stammen von Germain *et al.* (2008) und von Strandmann *et al.* (2006). Beide konnten zeigen, dass ein bifunktionelles Konstrukt, bestehend aus einem tumorspezifischen Antikörperfragment und einem NKG2D-Liganden, in der Lage war, bei primären NK-Zellen spezifisch die NK-Zell-vermittelte Lyse von Tumorzellen durch die NKG2D-Interaktion zu induzieren. Während Germain *et al.* (2008) einen murinen NKG2D-Liganden (H60) verwendeten, kam bei von Strandmann *et al.* (2006) der humane NKG2D-Ligand ULBP2 zum Einsatz. So konnte das bifunktionelle Konstrukt die Sekretion von IFN $\gamma$  durch NK-Zellen stimulieren, NK-Zellen aktivieren und somit eine NK-Zell-vermittelte Lyse von Tumorzellen induzieren (von Strandmann *et al.*, 2006).

Diese Experimente zeigen, dass die NKG2D-Rezeptor-abhängige Rekrutierung und Aktivierung von NK-Zellen prinzipiell ein tragfähiges Konzept zur Tumoreliminierung darstellt. Nach dem gegenwärtigen Stand kann das in dieser Arbeit entwickelte Konstrukt B3-MICA diese Aktivität allerdings nicht erfüllen. Stattdessen lässt sich festhalten, dass es sich bei B3-MICA, unabhängig von NK-Zellen, durchaus um ein potentes Immuntoxin handelt.

---

## 5 Ausblick

Für das Immuntoxin B3-LLO konnte eine Zelltyp-spezifische Adressierung und eine effiziente Eliminierung Antigen-positiver Zellen erreicht werden. Da das Fv-Fragment des B3-Antikörpers lediglich eine mikromolare Affinität zu seinem Antigen aufweist, könnte das *targeting* und damit die Effizienz des LLO-basierten Immuntoxins vermutlich durch die Kopplung an ein affineres Antikörperfragment weiter gesteigert werden. Dadurch ließe sich möglicherweise ein noch potenteres Immuntoxin generieren, was in fortführenden Zellkulturexperimenten untersucht werden müsste. Im nächsten Schritt sollte die Wirkung des Immuntoxins B3-LLO, welches eine Zelltyp-spezifische Adressierung an Antigen-positive Zellen erlaubt, *in vivo*, d. h. im Mausmodell untersucht werden.

Mit B3-MICA ließ sich ein bifunktionelles Protein generieren, was als Immuntoxin fungierte. In diesem Zusammenhang wäre eine genauere Analyse des B3-MICA induzierten Zelltodes, der die Ursachen der intrazellulären toxischen Wirkung klärt, sehr interessant.

Für die Wirkung des B3-MICA als Molekül, welches NK-Zellen rekrutiert und simultan aktiviert, müssten zunächst die Ursachen für die ausgebliebene biologische Aktivität geklärt werden. D. h., es müsste der Nachweis erfolgen, dass MICA-E<sub>8</sub>C spezifisch an NKG2D auf NK-Zellen binden kann. Des Weiteren müsste untersucht werden, ob diese Bindung und damit MICA-E<sub>8</sub>C im Kontext des B3-MICA auch unter Zellkulturbedingungen, speziell bei 37 °C, stabil ist. Das gesamte Konzept der Rekrutierung und Aktivierung der NK92-Zellen könnte mit dem Liganden ULBP2, für den die Bindung und Aktivierung bereits gezeigt werden konnte, überprüft werden. Dies könnte auch klären, ob für diese Studien primäre NK-Zellen gegebenenfalls geeigneter sind als eine Zelllinie. Weiterhin wäre dies eine gute Möglichkeit, um erneut die Vorteile des Konzeptes der Kopplung über polyionische Fusionspeptide zu bestätigen. Im Falle der Aktivierung der NK-Zellen wäre es wünschenswert, einen molekularen Marker für die Aktivität der Zellen zu finden. Möglicherweise könnte eines der untersuchten Chemokine bzw. Zytokine bei einer Aktivierung nachgewiesen werden. Dies würde auch nachfolgende Untersuchungen, wie die Analyse der intrazellulären Signalwege bei der NK-Zell-Aktivierung, vereinfachen.

---

## 6 Literaturverzeichnis

**Adams GP & Weiner LM** (2005) Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol.* Sep; 23(9):1147-1157

**Almog O, Benhar I, Vasmatzis G, Tordova M, Lee B, Pastan I, Gilliland GL** (1998) Crystal structure of the disulfide-stabilized Fv fragment of anticancer antibody B1: conformational influence of an engineered disulfide bond. *Proteins.* May 1; 31(2):128-138

**Arai S, Meagher R, Swearingen M, Myint H, Rich E, Martinson J, Klingemann H** (2008) Infusion of the allogeneic cell line NK-92 in patients with advanced renal cell cancer or melanoma: a phase I trial. *Cytotherapy.* 10(6):625-632

**Arakawa T & Timasheff SN** (1984) The mechanism of action of Na glutamate, lysine HCl, and piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid) in the stabilization of tubulin and microtubule formation. *J Biol Chem.* Apr 25;259(8):4979-4986

**Arakawa T & Timasheff SN** (1985) The stabilization of proteins by osmolytes. *Biophys J.* Mar;47(3):411-414

**Arnold FH & Zhang JH** (1994) Metal-mediated protein stabilization. *Trends Biotechnol.* May;12(5):189-192

**Bacha P, Williams DP, Waters C, Williams JM, Murphy JR, Strom TB** (1988) Interleukin 2 receptor-targeted cytotoxicity. Interleukin 2 receptor-mediated action of a diphtheria toxin-related interleukin 2 fusion protein. *J Exp Med.* Feb 1;167(2):612-622

**Baeuerle PA & Reinhardt C** (2009) Bispecific T-cell engaging antibodies for cancer therapy. *Cancer Res.* Jun 15;69(12):4941-4944

**Bagshawe KD** (1987) Antibody directed enzymes revive anti-cancer prodrugs concept. *Br J Cancer.* Nov;56(5):531-532

**Bahram S, Bresnahan M, Geraghty DE, Spies T** (1994) A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jul 5;91(14):6259-6263

**Bahram S & Spies T** (1996) Nucleotide sequence of a human MHC class I MICB cDNA. *Immunogenetics.* 43(4):230-233

**Bang S, Nagata S, Onda M, Kreitman RJ, Pastan I** (2005) HA22 (R490A) is a recombinant immunotoxin with increased antitumor activity without an increase in animal toxicity. *Clin Cancer Res.* Feb 15;11(4):1545-1550

**Bargou R, Leo E, Zugmaier G, Klinger M, Goebeler M, Knop S, Noppeney R, Viardot A, Hess G, Schuler M, Einsele H, Brandl C, Wolf A, Kirchinger P, Klappers P, Schmidt M, Riethmüller G, Reinhardt C, Baeuerle PA, Kufer P** (2008) Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody. *Science.* Aug 15;321(5891):974-977

**Barry M & Bleackley RC** (2002) Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol.* Jun;2(6):401-409

**Barsig J & Kaufmann SH** (1997) The mechanism of cell death in *Listeria monocytogenes*-infected murine macrophages is distinct from apoptosis. *Infect Immun.* Oct;65(10):4075-4081

- Batra JK, Jinno Y, Chaudhary VK, Kondo T, Willingham MC, FitzGerald DJ, Pastan I** (1989) Antitumor activity in mice of an immunotoxin made with anti-transferrin receptor and a recombinant form of *Pseudomonas* exotoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Nov;86(21):8545-8549
- Batra JK, Kasprzyk PG, Bird RE, Pastan I, King CR** (1992) Recombinant anti-erbB2 immunotoxins containing *Pseudomonas* exotoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jul 1;89(13):5867-5871
- Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, Spies T** (1999) Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science*. Jul 30;285(5428):727-729
- Bayley H** (1997) Toxin structure: part of a hole? *Curr Biol*. Dec 1;7(12):R763-767
- Becknell B & Caligiuri MA** (2005) Interleukin-2, interleukin-15, and their roles in human natural killer cells. *Adv Immunol*. 86:209-239
- Benhar I, Reiter Y, Pai LH, Pastan I** (1995) Administration of disulfide-stabilized Fv-immunotoxins B1(dsFv)-PE38 and B3(dsFv)-PE38 by continuous infusion increases their efficacy in curing large tumor xenografts in nude mice. *Int J Cancer*. Jul 28;62(3):351-355
- Bergelt S, Frost S, Lilie H** (2009) Listeriolysin O as cytotoxic component of an immunotoxin. *Protein Sci*. Jun;18(6):1210-1220
- Bhakdi S, Tranum-Jensen J, Sziegoleit A** (1985) Mechanism of membrane damage by streptolysin-O. *Infect Immun*. Jan;47(1):52-60
- Billadeau DD, Upshaw JL, Schoon RA, Dick CJ, Leibson PJ** (2003) NKG2D-DAP10 triggers human NK cell-mediated killing via a Syk-independent regulatory pathway. *Nat Immunol*. Jun;4(6):557-564
- Billington SJ, Jost BH, Songer JG** (2000) Thiol-activated cytolysins: structure, function and role in pathogenesis. *FEMS Microbiol Lett*. Jan 15;182(2):197-205
- Bird RE & Walker BW** (1991) Single chain antibody variable regions. *Trends Biotechnol*. Apr;9(4):132-137
- Birnboim HC, Doly J** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*. Nov 24;7(6):1513-1523
- Bolognesi A, Polito L et al.** (2000) In vitro anti-tumour activity of anti-CD80 and anti-CD86 immunotoxins containing type 1 ribosome-inactivating proteins. *Br J Haematol*. 2000 Aug;110(2):351-361
- Boulianne GL, Hozumi N, Shulman MJ** (1984) Production of functional chimaeric mouse/human antibody. *Nature*. Dec 13-19;312(5995):643-646
- Bourdeau RW, Malito E, Chenal A, Bishop BL, Musch MW, Villereal ML, Chang EB, Mosser EM, Rest RF, Tang WJ** (2009) Cellular functions and X-ray structure of anthrolysin O, a cholesterol-dependent cytolysin secreted by *Bacillus anthracis*. *J Biol Chem*. May 22;284(21):14645-14656
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. May 7;72:248-254
- Brinkmann U, Reiter Y, Jung SH, Lee B, Pastan I** (1993) A recombinant immunotoxin containing a disulfide-stabilized Fv fragment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Aug 15;90(16):7538-7542

- Brinkmann U, Keppler-Hafkemeyer A, Hafkemeyer P** (2001) Recombinant immunotoxins for cancer therapy. *Expert Opin Biol Ther.* Jul;1(4):693-702
- Brischwein K, Schlereth B, Guller B, Steiger C, Wolf A, Lutterbuese R, Offner S, Locher M, Urbig T, Raum T, Kleindienst P, Wimberger P, Kimmig R, Fichtner I, Kufer P, Hofmeister R, da Silva AJ, Baeuerle PA** (2006) MT110: a novel bispecific single-chain antibody construct with high efficacy in eradicating established tumors. *Mol Immunol.* Mar;43(8):1129-1143
- Bukowski JF, Warner JF, Dennert G, Welsh RM** (1985) Adoptive transfer studies demonstrating the antiviral effect of natural killer cells in vivo. *J Exp Med.* Jan 1;161(1):40-52
- Bursch W** (2001) The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death Differ.* Jun;8(6):569-581
- Carbone E, Neri P, Mesuraca M, Fulciniti MT, Otsuki T, Pende D, Groh V, Spies T, Pollio G, Cosman D, Catalano L, Tassone P, Rotoli B, Venuta S** (2005) HLA class I, NKG2D, and natural cytotoxicity receptors regulate multiple myeloma cell recognition by natural killer cells. *Blood.* Jan 1;105(1):251-258
- Carpenter JF, Arakawa T, Crowe JH** (1992) Interactions of stabilizing additives with proteins during freeze-thawing and freeze-drying. *Dev Biol Stand.* 74:225-238
- Carrero JA, Calderon B, Unanue ER** (2004) Listeriolysin O from *Listeria monocytogenes* is a lymphocyte apoptogenic molecule. *J Immunol.* Apr 15;172(8):4866-4874
- Carrero JA, Vivanco-Cid H, Unanue ER** (2008) Granzymes drive a rapid listeriolysin O-induced T cell apoptosis. *J Immunol.* Jul 15;181(2):1365-1374
- Carter P** (2001) Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nat Rev Cancer.* Nov;1(2):118-129
- Chahal FC, Entwistle J, Glover N, Macdonald GC** (2006) A targeted proteomic approach for the identification of tumor-associated membrane antigens using the ProteomeLab PF-2D in tandem with mass spectrometry. *Biochem Biophys Res Commun.* Sep 29;348(3):1055-1062
- Chames P & Baty D** (2009) Bispecific antibodies for cancer therapy. *Curr Opin Drug Discov Devel.* Mar;12(2):276-283
- Chang K & Pastan I** (1996) Molecular cloning of mesothelin, a differentiation antigen present on mesothelium, mesotheliomas, and ovarian cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jan 9;93(1):136-140
- Chen J, Jaracz S, Zhao X, Chen S, Ojima I** (2005) Antibody-cytotoxic agent conjugates for cancer therapy. *Expert Opin Drug Deliv.* Sep;2(5):873-890
- Chovnick A, Schneider WP, Tso JY, Queen C, Chang CN** (1991) A recombinant, membrane-acting immunotoxin. *Cancer Res.* Jan 15;51(2):465-467
- Cizeau J, Grenkow DM, Brown JG, Entwistle J, MacDonald GC** (2009) Engineering and biological characterization of VB6-845, an anti-EpCAM immunotoxin containing a T-cell epitope-depleted variant of the plant toxin bouganin. *J Immunother.* Jul-Aug;32(6):574-584
- Colucci F, Caligiuri MA, Di Santo JP** (2003) What does it take to make a natural killer? *Nat Rev Immunol.* May;3(5):413-425

- Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA** (2001) The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.* Nov;22(11):633-640
- Cosman D, Müllberg J, Sutherland CL, Chin W, Armitage R, Fanslow W, Kubin M, Chalupny NJ** (2001) ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity.* Feb;14(2):123-133
- Cossart P, Vicente MF, Mengaud J, Baquero F, Perez-Diaz JC, Berche P** (1989) Listeriolysin O is essential for virulence of *Listeria monocytogenes*: direct evidence obtained by gene complementation. *Infect Immun.* Nov;57(11):3629-3636
- Cossart P & Lecuit M** (1998) Interactions of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells during entry and actin-based movement: bacterial factors, cellular ligands and signaling. *EMBO J.* Jul 15;17(14):3797-3806
- Cowell JL & Bernheimer AW** (1977) Antigenic relationships among thiol-activated cytolysins. *Infect Immun.* Apr;16(1):397-399
- Dang NH, Pro B, Hagemester FB, Samaniego F, Jones D, Samuels BI, Rodriguez MA, Goy A, Romaguera JE, McLaughlin P, Tong AT, Turturro F, Walker PL, Fayad L** (2007) Phase II trial of denileukin diftitox for relapsed/refractory T-cell non-Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol.* Feb;136(3):439-447
- Das H, Groh V, Kuijl C, Sugita M, Morita CT, Spies T, Bukowski JF** (2001) MICA engagement by human Vgamma2Vdelta2 T cells enhances their antigen-dependent effector function. *Immunity.* Jul;15(1):83-93
- Davies DR & Cohen GH** (1996) Interactions of protein antigens with antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jan 9;93(1):7-12
- Decatur AL & Portnoy DA** (2000) A PEST-like sequence in listeriolysin O essential for *Listeria monocytogenes* pathogenicity. *Science.* Nov 3;290(5493):992-995
- Deguchi T, Chu TM, Leong SS, Horoszewicz JS, Lee CL** (1986) Effect of methotrexate-mono-clonal anti-prostatic acid phosphatase antibody conjugate on human prostate tumor. *Cancer Res.* Aug;46(8):3751-3755
- Denny WA** (2004) Tumor-activated prodrugs--a new approach to cancer therapy. *Cancer Invest.* 22(4):604-619
- Dillman RO, Johnson DE, Shawler DL, Koziol JA** (1988) Superiority of an acid-labile daunorubicin-mono-clonal antibody immunoconjugate compared to free drug. *Cancer Res.* Nov 1;48(21):6097-6102
- Dramsi S, Biswas I, Maguin E, Braun L, Mastroeni P, Cossart P** (1995) Entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes requires expression of inIB, a surface protein of the internalin multigene family. *Mol Microbiol.* Apr;16(2):251-261
- Dramsi S & Cossart P** (2002) Listeriolysin O: a genuine cytolysin optimized for an intracellular parasite. *J Cell Biol.* Mar 18;156(6):943-946
- Drevets DA, Sawyer RT, Potter TA, Campbell PA** (1995) *Listeria monocytogenes* infects human endothelial cells by two distinct mechanisms. *Infect Immun.* Nov;63(11):4268-4276

- Duffy MJ** (2005) Predictive markers in breast and other cancers: a review. *Clin Chem. Mar*;51(3): 494-503
- Duncan JL & Schlegel R** (1975) Effect of streptolysin O on erythrocyte membranes, liposomes, and lipid dispersions. A protein-cholesterol interaction. *J Cell Biol. Oct*;67(1):160-174
- Dyba M, Tarasova NI, Michejda CJ** (2004) Small molecule toxins targeting tumor receptors. *Curr Pharm Des. 10*(19):2311-2334
- Ellman GL** (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys. May*;82(1):70-77
- Enever C, Batuwangala T, Plummer C, Sepp A** (2009) Next generation immunotherapeutics-- honing the magic bullet. *Curr Opin Biotechnol. Aug*;20(4):405-411
- Fairbanks G, Steck TL, Wallach DF** (1971) Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry. 10*(13):2606-2617
- Farag SS & Caligiuri MA** (2004) Cytokine modulation of the innate immune system in the treatment of leukemia and lymphoma. *Adv Pharmacol. 51*:295-318
- Farag SS & Caligiuri MA** (2006) Human natural killer cell development and biology. *Blood Rev. May*;20(3):123-317
- Fauriat C, Long EO, Ljunggren HG, Bryceson YT** (2010) Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood. Mar 18*;115(11):2167-2176
- Feener EP, Shen WC, Ryser HJ** (1990) Cleavage of disulfide bonds in endocytosed macromolecules. A processing not associated with lysosomes or endosomes. *J Biol Chem. Nov 5*;265(31):18780-18785
- Fishwild DM, O'Donnell SL** (1996) High-avidity human IgG kappa monoclonal antibodies from a novel strain of minilocus transgenic mice. *Nat Biotechnol. Jul*;14(7):845-851
- FitzGerald DJ, Willingham MC, Cardarelli CO, Hamada H, Tsuruo T, Gottesman MM, Pastan I** (1987) A monoclonal antibody-Pseudomonas toxin conjugate that specifically kills multidrug-resistant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A. Jun*;84(12):4288-4292
- FitzGerald DJ, Kreitman R, Wilson W, Squires D, Pastan I** (2004) Recombinant immunotoxins for treating cancer. *Int J Med Microbiol. Apr*;293(7-8):577-582
- Flanagan JJ, Tweten RK, Johnson AE, Heuck AP** (2009) Cholesterol exposure at the membrane surface is necessary and sufficient to trigger perfringolysin O binding. *Biochemistry. May 12*;48(18): 3977-3987
- Flavell DJ** (1998) Saporin immunotoxins. *Curr Top Microbiol Immunol. 234*:57-61
- Foster B, Prussin C, Liu F, Whitmire JK, Whitton JL** (2007) Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *Curr Protoc Immunol. Aug*;Chapter 6:Unit 6.24
- Frankel AE, Kreitman RJ, Sausville EA** (2000) Targeted toxins. *Clin Cancer Res. Feb*;6(2):326-334
- Frankel AE, Neville DM, Bugge TA, Kreitman RJ, Leppla SH** (2003) Immunotoxin therapy of hematologic malignancies. *Semin Oncol. Aug*;30(4):545-557

**Frankel A, Liu JS, Rizzieri D, Hogge D** (2008) Phase I clinical study of diphtheria toxin-interleukin 3 fusion protein in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplasia. *Leuk Lymphoma*. Mar;49(3):543-553

**Frankel AE & Woo JH** (2009) Bispecific immunotoxins. *Leuk Res. Sep*;33(9):1173-1174

**Frei E, Kufe DW, Holland JF**: *Cancer Medicine*, 6<sup>th</sup> edition, BC Decker, London, 2003

**Friese MA, Platten M, Lutz SZ, Naumann U, Aulwurm S, Bischof F, Bühring HJ, Dichgans J, Rammensee HG, Steinle A, Weller M** (2003) MICA/NGK2D-mediated immunogene therapy of experimental gliomas. *Cancer Res*. Dec 15;63(24):8996-9006

**Frost S** (2009) Charakterisierung artifiziieller Fusionsproteine auf Basis polyionischer Fusionspeptide. Dissertation, Universität Halle-Wittenberg

**Gaillard JL, Berche P, Sansonetti P** (1986) Transposon mutagenesis as a tool to study the role of hemolysin in the virulence of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun*. Apr;52(1):50-55

**Gaillard JL, Berche P, Mounier J, Richard S, Sansonetti P** (1987) In vitro model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2. *Infect Immun*. Nov;55(11):2822-2829

**Galla HJ** (1988) *Spektroskopische Methoden in der Biochemie*. Thieme Verlag Stuttgart

**Garnett MC** (2001) Targeted drug conjugates: principles and progress. *Adv Drug Deliv Rev*. Dec 17;53(2):171-216

**Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T, Pérez-Villar JJ, López-Botet M, Duggan-Keen M, Stern PL** (1997) Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today*. Feb;18(2):89-95

**Gasnov SE, Rael ED, Gasnov NE, Vernon LP** (1995) In vitro evaluation of *Pyricularia* thionin-anti-CD5 immunotoxin. *Cancer Immunol Immunother*. Aug;41(2):122-128

**Geoffroy C, Gaillard JL, Alouf JE, Berche P** (1987) Purification, characterization, and toxicity of the sulfhydryl-activated hemolysin listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun*. Jul;55(7):1641-1646

**Germain C, Campigna E, Salhi I, Morisseau S, Navarro-Teulon I, Mach JP, Pèleguin A, Robert B** (2008) Redirecting NK cells mediated tumor cell lysis by a new recombinant bifunctional protein. *Protein Eng Des Sel*. Nov;21(11):665-672

**Giammarini C, Andreoni F, Amagliani G, Casiere A, Barocci S, Magnani M** (2003) High-level expression of the *Listeria monocytogenes* listeriolysin O in *Escherichia coli* and preliminary characterization of the purified protein. *Protein Expr Purif*. Mar;28(1):78-85

**Giammarini C, Andreoni F, Amagliani G, Casiere A, Barocci S, Magnani M** (2004) Purification and characterization of a recombinant listeriolysin O expressed in *Escherichia coli* and possible diagnostic applications. *J Biotechnol*. Apr 8;109(1-2):13-20

**Giddings KS, Zhao J, Sims PJ, Tweten RK** (2004) Human CD59 is a receptor for the cholesterol-dependent cytolysin intermedilysin. *Nat Struct Mol Biol*. Dec;11(12):1173-1178

**Gill SC & von Hippel PH** (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem* 182(2): 319-326

- Glennie MJ, McBride HM, Stirpe F, Thorpe PE, Worth AT, Stevenson GT** (1987) Emergence of immunoglobulin variants following treatment of a B cell leukemia with an immunotoxin composed of antiidiotypic antibody and saporin. *J Exp Med.* Jul 1;166(1):43-62
- Glennie MJ & Johnson PW** (2000) Clinical trials of antibody therapy. *Immunol Today.* Aug;21(8):403-410
- Glockshuber R, Malia M, Pfitzinger I, Plückthun A** (1990) A comparison of strategies to stabilize immunoglobulin Fv-fragments. *Biochemistry.* Feb 13;29(6):1362-1367
- Glomski IJ, Gedde MM, Tsang AW, Swanson JA, Portnoy DA** (2002) The *Listeria monocytogenes* hemolysin has an acidic pH optimum to compartmentalize activity and prevent damage to infected host cells. *J Cell Biol.* Mar 18;156(6):1029-1038
- Glomski IJ, Decatur AL, Portnoy DA** (2003) *Listeria monocytogenes* mutants that fail to compartmentalize listerolysin O activity are cytotoxic, avirulent, and unable to evade host extracellular defenses. *Infect Immun.* Dec;71(12):6754-6765
- Goldhirsch A, Colleoni M, Gelber RD** (2002) Endocrine therapy of breast cancer. *Ann Oncol.* 13 Suppl 4:61-68
- Goldstein JL, Anderson RG, Brown MS** (1979) Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis. *Nature.* Jun 21;279(5715):679-685
- Gong JH, Maki G, Klingemann HG** (1994) Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells. *Leukemia.* 1994 Apr;8(4):652-658
- González S, López-Soto A, Suarez-Alvarez B, López-Vázquez A, López-Larrea C** (2008) NKG2D ligands: key targets of the immune response. *Trends Immunol.* Aug;29(8):397-403
- Gorter A & Meri S** (1999) Immune evasion of tumor cells using membrane-bound complement regulatory proteins. *Immunol Today.* Dec;20(12):576-582
- Grauschopf U** (2000) Strukturelle und funktionelle Untersuchungen am humanen Parathormon-Rezeptor. Dissertation, Universität Halle-Wittenberg
- Groh V, Bahram S, Bauer S, Herman A, Beauchamp M, Spies T** (1996) Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Oct 29;93(22):12445-12450
- Groh V, Steinle A, Bauer S, Spies T** (1998) Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells. *Science.* Mar 13;279(5357):1737-1740
- Groh V, Rhinehart R, Secrist H, Bauer S, Grabstein KH, Spies T** (1999) Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jun 8;96(12):6879-6884
- Groh V, Rhinehart R, Randolph-Habecker J, Topp MS, Riddell SR, Spies T** (2001) Costimulation of CD8alphabeta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat Immunol.* Mar;2(3):255-260
- Guzman CA, Domann E, Rohde M, Bruder D, Darji A, Weiss S, Wehland J, Chakraborty T, Timmis KN** (1996) Apoptosis of mouse dendritic cells is triggered by listeriolysin, the major virulence determinant of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol.* Apr;20(1):119-126

**Günther C** (2005) Untersuchungen zum funktionellen Gentransfer zelltypspezifischer, virusanaloger Partikel. Dissertation, Universität Halle-Wittenberg

**Hafkemeyer P, Brinkmann U, Gottesman MM, Pastan I** (1999) Apoptosis induced by *Pseudomonas* exotoxin: a sensitive and rapid marker for gene delivery in vivo. *Hum Gene Ther.* Apr 10;10(6):923-934

**Hajra KM & Liu JR** (2004) Apoptosome dysfunction in human cancer. *Apoptosis.* Nov;9(6):691-704

**Hande KR** (1998) Clinical applications of anticancer drugs targeted to topoisomerase II. *Biochim Biophys Acta.* Oct 1;1400(1-3):173-184

**Harris M** (2004) Monoclonal antibodies as therapeutic agents for cancer. *Lancet Oncol.* May;5(5):292-302

**Harris RW, Sims PJ, Tweten RK** (1991) Kinetic aspects of the aggregation of *Clostridium perfringens* theta-toxin on erythrocyte membranes. A fluorescence energy transfer study. *J Biol Chem.* Apr 15;266(11):6936-6941

**Heckford SE, Gelmann EP, Agnor CL, Jacobson S, Zinn S, Matis LA** (1986) Distinct signals are required for proliferation and lymphokine gene expression in murine T cell clones. *J Immunol.* Dec 1;137(11):3652-3663

**Hellstrom I, Garrigues HJ, Garrigues U, Hellstrom KE** (1990) Highly tumor-reactive, internalizing, mouse monoclonal antibodies to Le(y)-related cell surface antigens. *Cancer Res.* Apr 1;50(7):2183-2190

**Heuck AP, Hotze EM, Tweten RK, Johnson AE** (2000) Mechanism of membrane insertion of a multimeric beta-barrel protein: perfringolysin O creates a pore using ordered and coupled conformational changes. *Mol Cell.* Nov;6(5):1233-1242

**Heuck AP, Savva CG, Holzenburg A, Johnson AE** (2007) Conformational changes that effect oligomerization and initiate pore formation are triggered throughout perfringolysin O upon binding to cholesterol. *J Biol Chem.* Aug 3;282(31):22629-22637

**Heuck AP, Moe PC, Johnson BB** (2010) The cholesterol-dependent cytolysin family of gram-positive bacterial toxins. *Subcell Biochem.* 51:551-577

**Hexham JM, Dudas D, Hugo R, Thompson J, King V, Dowling C, Neville DM Jr, Digan ME, Lake P** (2001) Influence of relative binding affinity on efficacy in a panel of anti-CD3 scFv immunotoxins. *Mol Immunol.* Sep;38(5):397-408

**Hill J, Andrew PW, Mitchell TJ** (1994) Amino acids in pneumolysin important for hemolytic activity identified by random mutagenesis. *Infect Immun.* Feb;62(2):757-758

**Holliger P, Prospero T, Winter G** (1993) "Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jul 15;90(14):6444-6448

**Holliger P & Hudson PJ** (2005) Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol.* Sep;23(9):1126-1136

**Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N et al.** (2004) Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* Jun 3;350(23):2335-2342

- Jacobs R, Hintzen G, Kemper A, Beul K, Kempf S, Behrens G, Sykora KW, Schmidt RE** (2001) CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells. *Eur J Immunol.* Oct;31(10):3121-3127
- Jacobs T, Darji A, Frahm N, Rohde M, Wehland J, Chakraborty T, Weiss S** (1998) Listeriolysin O: cholesterol inhibits cytolysis but not binding to cellular membranes. *Mol Microbiol.* Jun;28(6):1081-1089
- Jacobs T, Cima-Cabal MD et al.** (1999) The conserved undecapeptide shared by thiol-activated cytolysins is involved in membrane binding. *FEBS Lett.* Oct 15;459(3):463-466
- Jenkins EM, Njoku-Obi AN, Adams EW** (1964) Purification of the soluble hemolysins of *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol.* Aug;88:4418-4124
- Johannes L & Decaudin D** (2005) Protein toxins: intracellular trafficking for targeted therapy. *Gene Ther.* Sep;12(18):1360-1368
- Johnson MK, Geoffroy C, Alouf JE** (1980) Binding of cholesterol by sulfhydryl-activated cytolysins. *Infect Immun.* Jan;27(1):97-101
- Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS, Winter G** (1986) Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature.* May 29-Jun 4;321(6069):522-525
- Jones S & Portnoy DA** (1994) Characterization of *Listeria monocytogenes* pathogenesis in a strain expressing perfringolysin O in place of listeriolysin O. *Infect Immun.* Dec;62(12):5608-5613
- Jung SH, Pastan I, Lee BK** (1994) Design of interchain disulfide bonds in the framework region of the Fv fragment of the monoclonal antibody B3. *Proteins* 19: 35-47
- Kaminski MS, Zasadny KR, Francis IR, Fenner MC, Ross CW, Milik AW, Estes J, Tuck M, Regan D, Fisher S, Glenn SD, Wahl RL** (1996) Iodine-131-anti-B1 radioimmunotherapy for B-cell lymphoma. *J Clin Oncol.* Jul;14(7):1974-1981
- Kaminski MS, Estes J, Zasadny KR, Francis IR, Ross CW, Tuck M, Regan D, Fisher S, Gutierrez J, Kroll S, Stagg R, Tidmarsh G, Wahl RL** (2000) Radioimmunotherapy with iodine (131)I tositumomab for relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma: updated results and long-term follow-up of the University of Michigan experience. *Blood.* Aug 15;96(4):1259-1266
- Kärre K, Ljunggren HG, Piontek G, Kiessling R** (1986) Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature.* Feb 20-26;319(6055):675-678
- Kayal S & Charbit A** (2006) Listeriolysin O: a key protein of *Listeria monocytogenes* with multiple functions. *FEMS Microbiol Rev.* Jul;30(4):514-529
- Kipriyanov SM, Moldenhauer G, Strauss G, Little M** (1998) Bispecific CD3 x CD19 diabody for T cell-mediated lysis of malignant human B cells. *Int. J. Cancer* 77, 763-772
- Kiessling R, Klein E, Pross H, Wigzell H** (1975) (a) "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur J Immunol.* Feb;5(2):117-121
- Kiessling R, Klein E, Wigzell H** (1975) (b) "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol.* Feb;5(2):112-117

- Klausner RD, Donaldson JG, Lippincott-Schwartz J** (1992) Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J Cell Biol. Mar*;116(5):1071-1080
- Kleinschmidt M, Rudolph R, Lilie H** (2003) Design of a modular immunotoxin connected by polyionic adapter peptides. *J Mol Biol. Mar 21*;327(2):445-452
- Kleinschmidt M** (2004) Design modularer Immunotoxine unter Verwendung polyionischer Fusionspeptide. Dissertation, Universität Halle-Wittenberg
- Klingemann HG, Wong E, Maki G** (1996) A cytotoxic NK-cell line (NK-92) for ex vivo purging of leukemia from blood. *Biol Blood Marrow Transplant. May*;2(2):68-75
- Köhler G & Milstein C** (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *J Immunol. Mar 1*;174(5):2453-2455
- Korc M & Friesel RE** (2009) The role of fibroblast growth factors in tumor growth. *Curr Cancer Drug Targets. Aug*;9(5):639-51
- Kornbluth J, Spear B, Raab SS, Wilson DB** (1985) Evidence for the role of class I and class II HLA antigens in the lytic function of a cloned line of human natural killer cells. *J Immunol. Feb*;134(2):728-735
- Kragh-Hansen U, Chuang VT, Otagiri M** (2002) Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin. *Biol Pharm Bull. Jun*;25(6):695-704
- Kreitman RJ & Pastan I** (1998) Immunotoxins for targeted cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev. Apr 6*;31(1-2):53-88
- Kreitman RJ, Wilson WH, Robbins D, Margulies I, Stetler-Stevenson M, Waldmann TA, Pastan I** (1999) Responses in refractory hairy cell leukaemia to a recombinant immunotoxin. *Blood 94*, 3340-3348
- Kreitman RJ, Wilson WH, White JD, Stetler-Stevenson M, Jaffe ES, Giardina S, Waldmann TA, Pastan I** (2000) Phase I trial of recombinant immunotoxin anti-Tac(Fv)-PE38 (LMB-2) in patients with hematologic malignancies. *J Clin Oncol. Apr*;18(8):1622-1636
- Kreitman RJ** (2001) Chimeric fusion proteins--Pseudomonas exotoxin-based. *Curr Opin Investig Drugs. Sep*;2(9):1282-1293
- Kreitman RJ, Squires DR, Stetler-Stevenson M, Noel P, FitzGerald DJ, Wilson WH, Pastan I** (2005) Phase I trial of recombinant immunotoxin RFB4(dsFv)-PE38 (BL22) in patients with B-cell malignancies. *J Clin Oncol. Sep 20*;23(27):6719-6729
- Kreitman RJ** (2006) Immunotoxins for targeted cancer therapy. *AAPS J. Aug 18*;8(3):E532-551
- Kubetzko S, Balic E, Waibel R, Zangemeister-Wittke U, Plückthun A** (2006) PEGylation and multimerization of the anti-p185HER-2 single chain Fv fragment 4D5: effects on tumor targeting. *J Biol Chem. Nov 17*;281(46):35186-35201
- Kurschus FC, Kleinschmidt M, Fellows E, Dornmair K, Rudolph R, Lilie H, Jenne DE** (2004) Killing of target cells by redirected granzyme B in the absence of perforin. *FEBS Lett. Mar 26*;562(1-3):87-92

- Kyhse-Andersen J** (1984) Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods*. Dec;10(3-4):203-209
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. Aug 15; 227(5259):680-685
- Lanier LL, Phillips JH, Hackett J Jr, Tutt M, Kumar V** (1986) Natural killer cells: definition of a cell type rather than a function. *J Immunol*. Nov 1;137(9):2735-2739
- Lanier LL** (2003) Natural killer cell receptor signaling. *Curr Opin Immunol*. Jun;15(3):308-314
- Lanier LL** (2005) NK cell recognition. *Annu Rev Immunol*. 23:225-274
- Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA** (1996) CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol*. 1996;14:233-258
- Lety MA, Frehel C, Dubail I, Beretti JL, Kayal S, Berche P, Charbit A** (2001) Identification of a PEST-like motif in listeriolysin O required for phagosomal escape and for virulence in *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol*. Mar;39(5):1124-1139
- Li P, Willie ST, Bauer S, Morris DL, Spies T, Strong RK** (1999) Crystal structure of the MHC class I homolog MIC-A, a gammadelta T cell ligand. *Immunity*. May;10(5):577-584
- Li P, Morris DL, Willcox BE, Steinle A, Spies T, Strong RK** (2001) Complex structure of the activating immunoreceptor NKG2D and its MHC class I-like ligand MICA. *Nat Immunol*. May;2(5):443-451
- Liebermann J** (2003) The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol* May;3(5):361-370
- Ljunggren HG & Kärre K** (1985) Host resistance directed selectively against H-2-deficient lymphoma variants. Analysis of the mechanism. *J Exp Med*. Dec 1;162(6):1745-1759
- Ljunggren HG & Kärre K** (1990) In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today*. Jul;11(7):237-244
- Ljunggren HG & Malmberg KJ** (2007) Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer. *Nat Rev Immunol*. May;7(5):329-339
- Lode HN, Xiang R, Becker JC, Gillies SD, Reisfeld RA** (1998) Immunocytokines: a promising approach to cancer immunotherapy. *Pharmacol Ther*. Dec;80(3):277-292
- Lodoen MB & Lanier LL** (2005) Viral modulation of NK cell immunity. *Nat Rev Microbiol*. Jan;3(1):59-69
- López-Botet M & Bellón T** (1999) Natural killer cell activation and inhibition by receptors for MHC class I. *Curr Opin Immunol*. Jun;11(3):301-307
- Lord SJ, Rajotte RV, Korbitt GS, Bleackley RC** (2003) Granzyme B: a natural born killer. *Immunol Rev*. Jun;193:31-38
- Lou Q & Pastan I** (1999) A Lewis(y) epitope mimicking peptide induces anti-Lewis(y) immune responses in rabbits and mice. *J Pept Res*. Mar;53(3):252-260

- Lundin J, Kimby E, Björkholm M, Broliden PA, Celsing F, Hjalmar V, Möllgård L, Rebello P, Hale G, Waldmann H, Mellstedt H, Osterborg A** (2002) Phase II trial of subcutaneous anti-CD52 monoclonal antibody alemtuzumab (Campath-1H) as first-line treatment for patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Blood*. Aug 1;100(3):768-773
- Ma J & Waxman DJ** (2008) Combination of antiangiogenesis with chemotherapy for more effective cancer treatment. *Mol Cancer Ther*. Dec;7(12):3670-3684
- Mackaness GB** (1962) Cellular resistance to infection. *J Exp Med*. Sep 1;116:381-406
- Maki G, Klingemann HG, Martinson JA, Tam YK** (2001) Factors regulating the cytotoxic activity of the human natural killer cell line, NK-92. *J Hematother Stem Cell Res*. Jun;10(3):369-383
- Maki G, Tam YK, Berkahn L, Klingemann HG** (2003) Ex vivo purging with NK-92 prior to autografting for chronic myelogenous leukemia. *Bone Marrow Transplant*. Jun;31(12):1119-1125
- Maniatis T, Jeffrey A, van deSande H** (1975) Chain length determination of small double- and single-stranded DNA molecules by polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochemistry*. Aug 26; 14(17):3787-3794
- Manske JM, Buchsbaum DJ, Azemove SM, Hanna DE, Vallera DA** (1986) Antigenic modulation by anti-CD5 immunotoxins. *J Immunol*. Jun 15;136(12):4721-4728
- Margolin K** (2008) Cytokine therapy in cancer. *Expert Opin Biol Ther*. Oct;8(10):1495-1505
- Mathew M & Verma RS** (2009) Humanized immunotoxins: a new generation of immunotoxins for targeted cancer therapy. *Cancer Sci*. Aug;100(8):1359-1365
- May T, Gleiter S, Lilie H** (2002) Assessment of cell type specific gene transfer of polyoma virus like particles presenting a tumor specific antibody Fv fragment. *J Virol Methods*. Aug;105(1):147-157
- McGraw KJ, Rosenblum MG, Cheung L, Scheinberg DA** (1994) Characterization of murine and humanized anti-CD33, gelonin immunotoxins reactive against myeloid leukemias. *Cancer Immunol Immunother*. Dec;39(6):367-374
- McLaughlin P, Grillo-López AJ, Link BK, Levy R, Czuczman MS, Williams ME, Heyman MR, Bence-Bruckler I, White CA, Cabanillas F, Jain V, Ho AD, Lister J, Wey K, Shen D, Dallaire BK** (1998) Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol*. Aug;16(8):2825-2833
- Melero I, Vile RG, Colombo MP** (2000) Feeding dendritic cells with tumor antigens: self-service buffet or à la carte? *Gene Ther*. Jul;7(14):1167-1170
- Mengaud J, Chenevert J, Geoffroy C, Gaillard JL, Cossart P** (1987) Identification of the structural gene encoding the SH-activated hemolysin of *Listeria monocytogenes*: listeriolysin O is homologous to streptolysin O and pneumolysin. *Infect Immun*. Dec;55(12):3225-3227
- Mengaud J, Vicente MF, Chenevert J, Pereira JM, Geoffroy C, Gicquel-Sanzey B, Baquero F, Perez-Diaz JC, Cossart P** (1988) Expression in *Escherichia coli* and sequence analysis of the listeriolysin O determinant of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun*. Apr;56(4):766-772
- Michel E, Reich KA, Favier R, Berche P, Cossart P** (1990) Attenuated mutants of the intracellular bacterium *Listeria monocytogenes* obtained by single amino acid substitutions in listeriolysin O. *Mol Microbiol*. Dec;4(12):2167-2178

- Milenic DE & Brechbiel MW** (2004) Targeting of radio-isotopes for cancer therapy. *Cancer Biol Ther.* Apr;3(4):361-370
- Moolten FL, Cooperband SR** (1970) Selective destruction of target cells by diphtheria toxin conjugated to antibody directed against antigens on the cells. *Science.* Jul 3;169(940):68-70
- Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Cantoni C, Mingari MC, Biassoni R, Moretta L** (2001) Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol.* 19:197-223
- Morrison SL, Johnson MJ, Herzenberg LA, Oi VT** (1984) Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Nov;81(21):6851-6855
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Ehrlich H** (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 51 Pt 1:263-273
- Müller D & Kontermann RE** (2007) Recombinant bispecific antibodies for cellular cancer immunotherapy. *Curr Opin Mol Ther.* Aug;9(4):319-326
- Muñoz R, Arias Y, Ferreras JM, Rojo MA, Gayoso MJ, Nocito M, Benitez J, Jiménez P, Bernabéu C, Girbés T** (2007) Targeting a marker of the tumour neovasculature using a novel anti-human CD105-immunotoxin containing the non-toxic type 2 ribosome-inactivating protein nigrin b. *Cancer Lett.* Oct 18;256(1):73-80
- Nabhan C, Rundhaugen LM, Riley MB, Rademaker A, Boehlke L, Jatoi M, Tallman MS** (2005) Phase II pilot trial of gemtuzumab ozogamicin (GO) as first line therapy in acute myeloid leukemia patients age 65 or older. *Leuk Res.* Jan;29(1):53-57
- Nagashima S, Mailliard R, Kashii Y, Reichert TE, Herberman RB, Robbins P, Whiteside TL** (1998) Stable transduction of the interleukin-2 gene into human natural killer cell lines and their phenotypic and functional characterization in vitro and in vivo. *Blood.* May 15;91(10):3850-3861
- Nesterenko MV, Tilley M, Upton SJ** (1994) A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. *J Biochem Biophys Methods.* Apr; 28(3):239-242
- Oeltman TN & Frankel AE** (1991) Advances in immunotoxins. *FASEB J.* Jul;5(10):2334-2337
- Onda M, Wang QC, Guo HF, Cheung NK, Pastan I** (2004) In vitro and in vivo cytotoxic activities of recombinant immunotoxin 8H9(Fv)-PE38 against breast cancer, osteosarcoma, and neuroblastoma. *Cancer Res.* Feb 15;64(4):1419-1424
- Oratz R, Speyer JL, Wernz JC, Hochster H, Meyers M, Mischak R, Spitzer LE** (1990) Antimelanoma monoclonal antibody-ricin A chain immunoconjugate (XMMME-001-RTA) plus cyclophosphamide in the treatment of metastatic malignant melanoma: results of a phase II trial. *J Biol Response Mod.* Aug;9(4):345-354
- Ortaldo JR, Oldham RK, Cannon GC, Herberman RB** (1977) Specificity of natural cytotoxic reactivity of normal human lymphocytes against a myeloid leukemia cell line. *J Natl Cancer Inst.* Jul;59(1):77-82
- Pai LH, Wittes R, Setser A, Willingham MC, Pastan I** (1996) Treatment of advanced solid tumors with immunotoxin LMB-1: an antibody linked to Pseudomonas exotoxin. *Nat Med.* Mar;2(3):350-353

**Palmer M, Harris R, Freytag C, Kehoe M, Trantum-Jensen J, Bhakdi S** (1998) Assembly mechanism of the oligomeric streptolysin O pore: the early membrane lesion is lined by a free edge of the lipid membrane and is extended gradually during oligomerization. *EMBO J.* Mar 16;17(6):1598-1605

**Pastan I, Lovelace ET, Gallo MG, Rutherford AV, Magnani JL, Willingham MC** (1991) Characterization of monoclonal antibodies B1 and B3 that react with mucinous adenocarcinomas. *Cancer Res.* Jul 15;51(14):3781-3787

**Pastan IH, Archer GE, McLendon RE, Friedman HS, Fuchs HE, Wang QC, Pai LH, Herndon J, Bigner DD** (1995) Intrathecal administration of single-chain immunotoxin, LMB-7 [B3(Fv)-PE38], produces cures of carcinomatous meningitis in a rat model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Mar 28;92(7):2765-2769

**Pastan I, Hassan R, FitzGerald DJ, Kreitman RJ** (2007) Immunotoxin treatment of cancer. *Annu Rev Med.* 58:221-237

**Pavlakakis N & Vogelzang NJ** (2006) Ranpirnase--an antitumour ribonuclease: its potential role in malignant mesothelioma. *Expert Opin Biol Ther.* Apr;6(4):391-399

**Peipp M & Valerius T** (2002) Bispecific antibodies targeting cancer cells. *Biochem Soc Trans.* Aug;30(4):507-511

**Pende D, Rivera P, Marcenaro S, Chang CC, Biassoni R, Conte R, Kubin M, Cosman D, Ferrone S, Moretta L, Moretta A** (2002) Major histocompatibility complex class I-related chain A and UL16-binding protein expression on tumor cell lines of different histotypes: analysis of tumor susceptibility to NKG2D-dependent natural killer cell cytotoxicity. *Cancer Res.* Nov 1;62(21):6178-6186

**Perentesis JP, Waddick KG, Bendel AE, Shao Y, Warman BE, Chandan-Langlie M, Uckun FM** (1997) Induction of apoptosis in multidrug-resistant and radiation-resistant acute myeloid leukemia cells by a recombinant fusion toxin directed against the human granulocyte macrophage colony-stimulating factor receptor. *Clin Cancer Res.* Mar;3(3):347-355

**Piasek P** (1999) FDA approves fusion protein for treatment of lymphoma. *J Am Pharm Assoc (Wash).* Jul-Aug;39(4):571-572

**Pinkney M, Beachey E, Kehoe M** (1989) The thiol-activated toxin streptolysin O does not require a thiol group for cytolytic activity. *Infect Immun.* Aug;57(8):2553-2558

**Piriou L, Chilmonczyk S, Genetet N, Albina E** (2000) Design of a flow cytometric assay for the determination of natural killer and cytotoxic T-lymphocyte activity in human and in different animal species. *Cytometry.* Dec 1;41(4):289-297

**Portnoy DA, Chakraborty T, Goebel W, Cossart P** (1992) Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Infect Immun.* Apr;60(4):1263-1267

**Portnoy DA, Auerbuch V, Glomski IJ** (2002) The cell biology of *Listeria monocytogenes* infection: the intersection of bacterial pathogenesis and cell-mediated immunity. *J Cell Biol.* Aug 5;158(3):409-414

**Posey JA et al.** (2002) A phase I trial of the single-chain immunotoxin SGN-10 (BR96 sFv-PE40) in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* 8, 3092-3099

**Press OW, Eary JF, Appelbaum FR, Martin PJ, Nelp WB, Glenn S, Fisher DR, Porter B, Matthews DC, Gooley T, et al.** (1995) Phase II trial of 131I-B1 (anti-CD20) antibody therapy with autologous stem cell transplantation for relapsed B cell lymphomas. *Lancet*. Aug 5;346(8971):336-340

**Press OW** (1999) Radiolabeled antibody therapy of B-cell lymphomas. *Semin Oncol*. Oct;26(5 Suppl 14):58-65

**Prigent D & Alouf JE** (1976) Interaction of steptolysin O with sterols. *Biochim Biophys Acta*. Aug 16;443(2):288-300

**Pukac L, Kanakaraj P et al.** (2005) HGS-ETR1, a fully human TRAIL-receptor 1 monoclonal antibody, induces cell death in multiple tumour types in vitro and in vivo. *Br J Cancer*. Apr 25;92(8):1430-1441

**Rajagopalan S, Fu J, Long EO** (2001) Cutting edge: induction of IFN-gamma production but not cytotoxicity by the killer cell Ig-like receptor KIR2DL4 (CD158d) in resting NK cells. *J Immunol*. Aug 15;167(4):1877-1881

**Ramachandran R, Tweten RK, Johnson AE** (2004) Membrane-dependent conformational changes initiate cholesterol-dependent cytolysin oligomerization and intersubunit beta-strand alignment. *Nat Struct Mol Biol*. Aug;11(8):697-70

**Reiter Y, Pai LH, Brinkmann U, Wang QC, Pastan I** (1994) Antitumor activity and pharmacokinetics in mice of a recombinant immunotoxin containing a disulfide-stabilized Fv fragment. *Cancer Res*. May 15;54(10):2714-2718

**Rheingold S, Neugut A, Meadows A** in Frei E, Kufe DW, Holland JF: *Cancer Medicine*, 6<sup>th</sup> edition, BC Decker, London, 2003

**Richter SA, Stubenrauch K, Lilie H, Rudolph R** (2001) Polyionic fusion peptides function as specific dimerization motifs. *Protein Eng*. Oct;14(10):775-783

**Roberg K, Johansson U, Ollinger K** (1999) Lysosomal release of cathepsin D precedes relocation of cytochrome c and loss of mitochondrial transmembrane potential during apoptosis induced by oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. Dec;27(11-12):1228-1237

**Robertson MJ, Cochran KJ, Cameron C, Le JM, Tantravahi R, Ritz J** (1996) Characterization of a cell line, NKL, derived from an aggressive human natural killer cell leukemia. *Exp Hematol*. Feb;24(3):406-415

**Robinson BW & Morstyn G** (1987) Natural killer (NK)-resistant human lung cancer cells are lysed by recombinant interleukin-2-activated NK cells. *Cell Immunol*. May;106(2):215-222

**Robinson BW, Mukherjee SA et al.** (1998) Cytokine gene therapy or infusion as treatment for solid human cancer. *J Immunother*. May;21(3):211-217

**Rogers HW, Callery MP, Deck B, Unanue ER** (1996) *Listeria monocytogenes* induces apoptosis of infected hepatocytes. *J Immunol*. Jan 15;156(2):679-684

**Rosenberg SA, Yang JC, White DE, Steinberg SM** (1998) Durability of complete responses in patients with metastatic cancer treated with high-dose interleukin-2: identification of the antigens mediating response. *Ann Surg*. Sep;228(3):307-319

**Rosenberg SA** (2000) Interleukin-2 and the development of immunotherapy for the treatment of patients with cancer. *Cancer J Sci Am*. Feb;6 Suppl 1:S2-7

**Rosenblum MG, Cheung LH, Liu Y, Marks JW 3rd** (2003) Design, expression, purification, and characterization, in vitro and in vivo, of an antimelanoma single-chain Fv antibody fused to the toxin gelonin. *Cancer Res.* Jul 15;63(14):3995-4002

**Rossjohn J, Feil SC, McKinstry WJ, Tweten RK, Parker MW** (1997) Structure of a cholesterol-binding, thiol-activated cytolysin and a model of its membrane form. *Cell.* May 30;89(5):685-692

**Rudolph R, Boehm G, Lilie H, Jaenicke R** (1997) Folding Proteins. In: Creighton T.E. (Hrsg.): (1997) Protein function – a practical approach, 57-99

**Saito G, Amidon GL, Lee KD** (2003) Enhanced cytosolic delivery of plasmid DNA by a sulfhydryl-activatable listeriolysin O/protamine conjugate utilizing cellular reducing potential. *Gene Ther.* Jan;10(1):72-83

**Sakamoto J, Furukawa K, Cordon-Cardo C, Yin BW, Rettig WJ, Oettgen HF, Old LJ, Lloyd KO** (1986) Expression of Lewisa, Lewisb, X, and Y blood group antigens in human colonic tumors and normal tissue and in human tumor-derived cell lines. *Cancer Res.* Mar;46(3):1553-1561

**Salih HR, Rammensee HG, Steinle A** (2002) Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. *J Immunol.* Oct 15;169(8):4098-4102

**Salih HR, Antropius H, Gieseke F, Lutz SZ, Kanz L, Rammensee HG, Steinle A** (2003) Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia. *Blood.* Aug 15;102(4):1389-1396

**Schmid FX.** Optical spectroscopy to characterize protein conformation and conformational changes. In Creighton, T.E., 2<sup>nd</sup> ed. Protein structure, a practical approach. 1997; Oxford University Press

**Schnupf P, Portnoy DA, Decatur AL** (2006) Phosphorylation, ubiquitination and degradation of listeriolysin O in mammalian cells: role of the PEST-like sequence. *Cell Microbiol.* Feb;8(2):353-364

**Schrama D, Reisfeld RA., Becker JC** (2006) Antibody targeted drugs as cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* Feb;5(2):147-159

**Schuster M, Umana P et al.** (2005) Improved effector functions of a therapeutic monoclonal Lewis Y-specific antibody by glycoform engineering. *Cancer Res.* Sep 1;65(17):7934-7941

**Segal DM, Weiner GJ, Weiner LM** (1999) Bispecific antibodies in cancer therapy. *Curr Opin Immunol.* Oct;11(5):558-562

**Sekino-Suzuki N, Nakamura M, Mitsui KI, Ohno-Iwashita Y** (1996) Contribution of individual tryptophan residues to the structure and activity of theta-toxin (perfringolysin O), a cholesterol-binding cytolysin. *Eur J Biochem.* Nov 1;241(3):941-947

**Sellman BR, Kagan BL, Tweten RK** (1997) Generation of a membrane-bound, oligomerized pre-pore complex is necessary for pore formation by *Clostridium septicum* alpha toxin. *Mol Microbiol.* Feb;23(3):551-558

**Shatursky O, Heuck AP, Shepard LA, Rossjohn J, Parker MW, Johnson AW, Tweten RK** (1999) The mechanism of membrane insertion for a cholesterol-dependent cytolysin: a novel paradigm for pore-forming toxins. *Cell.* Oct 29;99(3):293-299

**Shen WC, Ballou B, Ryser HJ, Hakala TR** (1986) Targeting, internalization, and cytotoxicity of methotrexate-monoclonal anti-stage-specific embryonic antigen-1 antibody conjugates in cultured F-9 teratocarcinoma cells. *Cancer Res.* Aug;46(8):3912-3916

- Sievers EL, Appelbaum FR, Spielberger RT, Forman SJ, Flowers D, Smith FO, Shannon-Dorcy K, Berger MS, Bernstein ID** (1999) Selective ablation of acute myeloid leukemia using antibody-targeted chemotherapy: a phase I study of an anti-CD33 calicheamicin immunoconjugate. *Blood*. Jun 1;93(11):3678-3684
- Sirén J, Sareneva T, Pirhonen J, Strengell M, Veckman V, Julkunen I, Matikainen S** (2004) Cytokine and contact-dependent activation of natural killer cells by influenza A or Sendai virus-infected macrophages. *J Gen Virol*. Aug;85(Pt 8):2357-2364
- Smith DB & Johnson KS.** (1988) Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene*. Jul 15;67(1):31-40
- Stachowiak R, Wiśniewski J, Osińska O, Bielecki J** (2009) Contribution of cysteine residue to the properties of *Listeria monocytogenes* listeriolysin O. *Can J Microbiol*. Oct;55(10):1153-1159
- Staerz UD, Kanagawa O, Bevan MJ** (1985) Hybrid antibodies can target sites for attack by T cells. *Nature*. Apr 18-24;314(6012):628-631
- Steinle A, Li P, Morris DL, Groh V, Lanier LL, Strong RK, Spies T** (2001) Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family. *Immunogenetics*. May-Jun;53(4):279-87
- Stubenrauch K, Gleiter S, Brinkmann U, Rudolph R, Lilie H** (2001) Conjugation of an antibody Fv fragment to a virus coat protein: cell-specific targeting of recombinant polyoma-virus-like particles. *Biochem J*. Jun 15;356(Pt 3):867-873
- Sutlu T & Alici E** (2009) Natural killer cell-based immunotherapy in cancer: current insights and future prospects. *J Intern Med*. Aug;266(2):154-181
- Tam YK, Maki G, Miyagawa B, Hennemann B, Tonn T, Klingemann HG.** (1999) Characterization of genetically altered, interleukin 2-independent natural killer cell lines suitable for adoptive cellular immunotherapy. *Hum Gene Ther*. May 20;10(8):1359-1373
- Tam YK, Miyagawa B, Ho VC, Klingemann HG** (1999) Immunotherapy of malignant melanoma in a SCID mouse model using the highly cytotoxic natural killer cell line NK-92. *J Hematother*. Jun;8(3):281-290
- Tay CH, Szomolanyi-Tsuda E, Welsh RM** (1998) Control of infections by NK cells. *Curr Top Microbiol Immunol*. 230:193-220
- Thorpe PE, Wallace PM, Knowles PP, Relf MG, Brown AN, Watson GJ, Blakey DC, Newell DR.** (1988) Improved antitumor effects of immunotoxins prepared with deglycosylated ricin A-chain and hindered disulfide linkages. *Cancer Res*. Nov 15;48(22):6396-6403
- Tolcher Aw, Sugarman S et al.** (1999) Randomized phase II study of BR96-doxorubicin conjugate in patients with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. Feb;17(2):478-484
- Tonn T, Becker S, Esser R, Schwabe D, Seifried E** (2001) Cellular immunotherapy of malignancies using the clonal natural killer cell line NK-92. *J Hematother Stem Cell Res*. Aug;10(4):535-544
- Tsutsumi Y, Onda M, Nagata S, Lee B, Kreitman RJ, Pastan I** (2000) Site-specific chemical modification with polyethylene glycol of recombinant immunotoxin anti-Tac(Fv)-PE38 (LMB-2) improves antitumor activity and reduces animal toxicity and immunogenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jul 18;97(15):8548-8553

**Tweten RK** (2005) Cholesterol-dependent cytolysins, a family of versatile pore-forming toxins. *Infect Immun.* Oct;73(10):6199-6209

**Van Cutsem E, Köhne CH, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien CR, Makhson A, D'Haens G, Pintér T, Lim R, Bodoky G, Roh JK, Folprecht G, Ruff P, Stroh C, Tejpar S, Schlichting M, Nippgen J, Rougier P** (2009) Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* Apr 2;360(14):1408-1417

**Vetter CS, Groh V, thor Straten P, Spies T, Bröcker EB, Becker JC** (2002) Expression of stress-induced MHC class I related chain molecules on human melanoma. *J Invest Dermatol.* Apr;118(4):600-605

**Vetter CS, Lieb W, Bröcker EB, Becker JC** (2004) Loss of nonclassical MHC molecules MIC-A/B expression during progression of uveal melanoma. *Br J Cancer.* Oct 18;91(8):1495-1499

**Vitale M, Zamai L, Neri LM, Manzoli L, Facchini A, Papa S** (1991) Natural killer function in flow cytometry: identification of human lymphoid subsets able to bind to the NK sensitive target K562. *Cytometry.* 12(8):717-722

**Vivier E & Colonna M** (2006) Strategies of Natural Killer Cell Recognition and Signaling, in *Immunobiology of Natural Killer Cell Receptors*, ed. Vivier, Colonna; Springer Verlag, 8-9

**Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S** (2008) Functions of natural killer cells. *Nat Immunol.* May;9(5):503-510

**Voet D & Voet JG, Pratt CW** (2002) *Lehrbuch der Biochemie.* Wiley-VHC Verlag GmbH & Co KGaA, Weinheim

**Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L, Slamon DJ, Murphy M, Novotny WF, Burchmore M, Shak S, Stewart SJ, Press M** (2002) Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* Feb 1;20(3):719-726

**von Minckwitz G, Harder S, Hövelmann S, Jäger E, Al-Batran SE, Loibl S, Atmaca A, Cimpoiasu C, Neumann A, Abera A, Knuth A, Kaufmann M, Jäger D, Maurer AB, Wels WS** (2005) Phase I clinical study of the recombinant antibody toxin scFv(FRP5)-ETA specific for the ErbB2/HER2 receptor in patients with advanced solid malignomas. *Breast Cancer Res.*;7(5):R617-626

**von Strandmann EP, Hansen HP, Reiners KS, Schnell R, Borchmann P, Merkert S, Simhadri VR, Draube A, Reiser M, Purr I, Hallek M, Engert A** (2006) A novel bispecific protein (ULBP2-BB4) targeting the NKG2D receptor on natural killer (NK) cells and CD138 activates NK cells and has potent antitumor activity against human multiple myeloma in vitro and in vivo. *Blood.* Mar 1;107(5):1955-1962

**Walker B, Krishnasastri M, Zorn L, Bayley H** (1992) Assembly of the oligomeric membrane pore formed by Staphylococcal alpha-hemolysin examined by truncation mutagenesis. *J Biol Chem* 267; 21782-21786

**Wan L, Zeng L, Chen L, Huang Q, Li S, Lu Y, Li Y, Cheng J, Lu X** (2006) Expression, purification, and refolding of a novel immunotoxin containing humanized single-chain fragment variable antibody against CTLA4 and the N-terminal fragment of human perforin. *Protein Expr Purif.* Aug;48(2):307-313

- Wang QC, Pai LH, Debinski W, FitzGerald DJ, Pastan I** (1993) Polyethylene glycol-modified chimeric toxin composed of transforming growth factor alpha and *Pseudomonas* exotoxin. *Cancer Res.* Oct 1;53(19):4588-4594
- Wang R, Gan C, Gao W, He W, Wang X, Peng Y, Zhuo J, Tan J, Peng X, Wu J, Luo G** (2010) A novel recombinant immunotoxin with the smallest ribosome-inactivating protein Luffin P1: T-cell cytotoxicity and prolongation of allograft survival. *J Cell Mol Med.* Mar;14(3):578-586
- Weiner LM, Surana R, Wang S** (2010) Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* May;10(5):317-327
- Weis WI, Taylor ME, Drickamer K** (1998) The C-type lectin superfamily in the immune system. *Immunol Rev.* Jun;163:19-34
- West WH, Cannon GB, Kay HD, Bonnard GD, Herberman RB.** (1977) Natural cytotoxic reactivity of human lymphocytes against a myeloid cell line: characterization of effector cells. *J Immunol.* Jan;118(1):355-361
- Wex T, Wex H, Hartig R, Wilhelmsen S, Malfertheiner P** (2003) Functional involvement of cathepsin W in the cytotoxic activity of NK-92 cells. *FEBS Lett.* Sep 25;552(2-3):115-119
- Wierda WG, Kipps TJ, Mayer J, Stilgenbauer S, Williams CD, Hellmann A, Robak T, Furman RR, Hillmen P, Trneny M, Dyer MJ, Padmanabhan S, Piotrowska M, Kozak T, Chan G, Davis R, Losic N, Wilms J, Russell CA, Osterborg A; Hx-CD20-406 Study Investigators** (2010) Ofatumumab as single-agent CD20 immunotherapy in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol.* Apr 1;28(10):1749-1755
- Wolf P, Alt K, Wetterauer D, Bühler P, Gierschner D, Katzenwadel A, Wetterauer U, Elsässer-Beile U** (2010) Preclinical evaluation of a recombinant anti-prostate specific membrane antigen single-chain immunotoxin against prostate cancer. *J Immunother.* Apr;33(3):262-271
- Wood S, Maroushek N, Czuprynski CJ** (1993) Multiplication of *Listeria monocytogenes* in a murine hepatocyte cell line. *Infect Immun* 61: 3068-3072
- Woof JM & Burton DR** (2004) Human antibody-Fc receptor interactions illuminated by crystal structures. *Nat Rev Immunol.* Feb;4(2):89-99
- Wu C** (2009) Diabodies: molecular engineering and therapeutic applications. *Drug News Perspect.* Oct;22(8):453-458
- Wu J, Song Y, Bakker AB, Bauer S, Spies T, Lanier LL, Phillips JH** (1999) An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science.* Jul 30;285(5428):730-732
- Wu J, Cherwinski H, Spies T, Phillips JH, Lanier LL** (2000) DAP10 and DAP12 form distinct, but functionally cooperative, receptor complexes in natural killer cells. *J Exp Med.* Oct 2;192(7):1059-1068
- Xiang R, Lode HN, Dolman CS, Dreier T, Varki NM, Qian X, Lo KM, Lan Y, Super M, Gillies SD, Reisfeld RA** (1997) Elimination of established murine colon carcinoma metastases by antibody-interleukin 2 fusion protein therapy. *Cancer Res.* Nov 1;57(21):4948-4955.
- Yamaizumi M, Mekada E, Uchida T, Okada Y** (1978) One molecule of diphtheria toxin fragment A introduced into a cell can kill the cell. *Cell.* Sep;15(1):245-250

**Yan Y, Steinherz P, Klingemann HG, Dennig D, Childs BH, McGuirk J, O'Reilly RJ** (1998) Antileukemia activity of a natural killer cell line against human leukemias. *Clin Cancer Res.* Nov;4(11):2859-2868

**Zalutsky MR & Vaidyanathan G** (2000) Astatine-211-labeled radiotherapeutics: an emerging approach to targeted alpha-particle radiotherapy. *Curr Pharm Des.* Sep;6(14):1433-1455

**Zamai L, Mariani AR, Zauli G, Rodella L, Rezzani R, Manzoli FA, Vitale M** (1998) Kinetics of in vitro natural killer activity against K562 cells as detected by flow cytometry. *Cytometry.* Aug 1;32(4):280-285

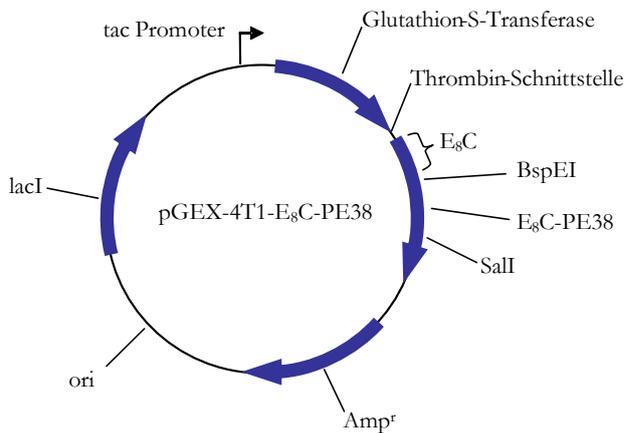
**Zompi S, Hamerman JA, Ogasawara K, Schweighoffer E, Tybulewicz VL, Di Santo JP, Lanier LL, Colucci F** (2003) NKG2D triggers cytotoxicity in mouse NK cells lacking DAP12 or Syk family kinases. *Nat Immunol.* Jun;4(6):565-572

**Zou Y, Mirbaha F, Stastny P** (2006) Contact inhibition causes strong downregulation of expression of MICA in human fibroblasts and decreased NK cell killing. *Hum Immunol.* Mar;67(3):183-187

---

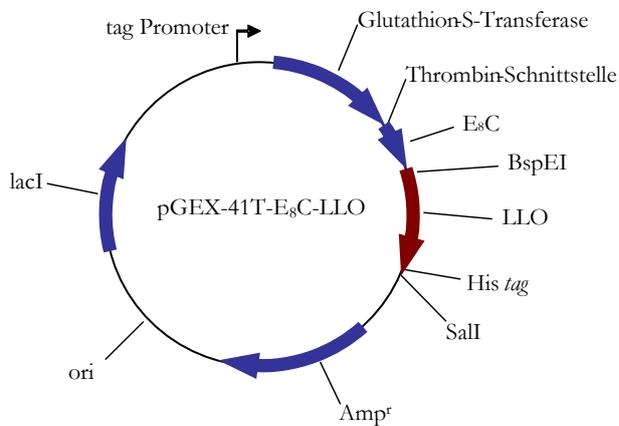
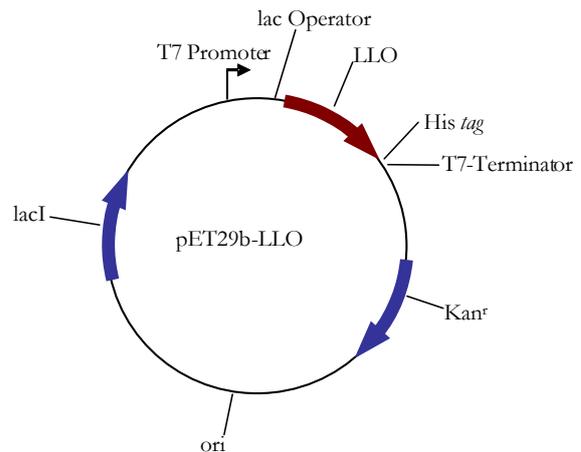
# 7 Anhang

## 7.1 Konstruktion der Expressionsvektoren



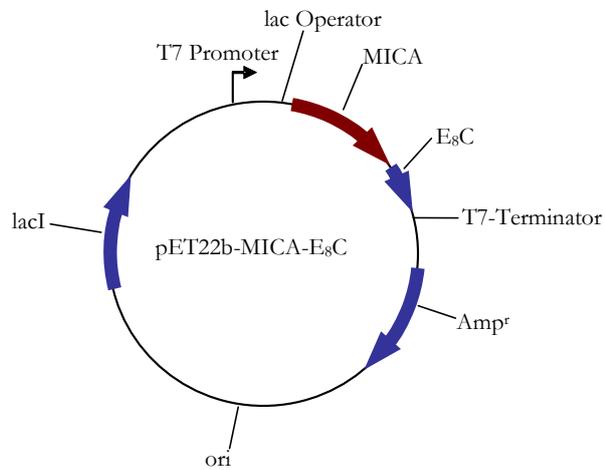
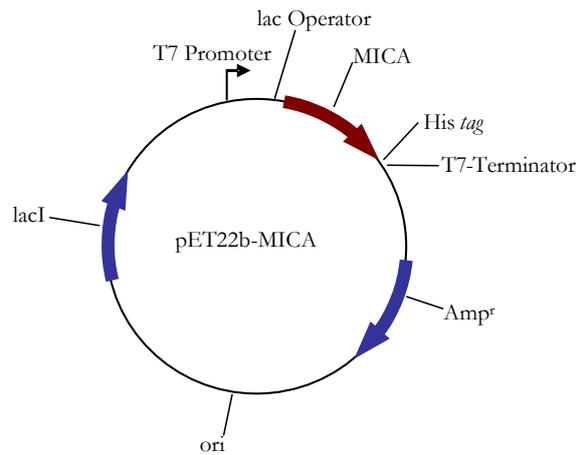
**Abbildung 7.1:** Plasmidkarte des Expressionsvektors pGEX-4T1-E<sub>8</sub>C-PE38 (Ausgangskonstrukt)

**Abbildung 7.2:** Plasmidkarte des Expressionsvektors pET29b-LLO (Ausgangskonstrukt)



**Abbildung 7.3:** Plasmidkarte des Expressionsvektors pGEX-4T1-E<sub>8</sub>C-LLO (erstelltes Konstrukt)

**Abbildung 7.4:** Plasmidkarte des Expressionsvektors pET22b-MICA (Ausgangskonstrukt)



**Abbildung 7.5:** Plasmidkarte des Expressionsvektors pET22b-MICA-E<sub>8</sub>C (erstelltes Konstrukt)

## 7.2 Biophysikalische Daten verwendeter Proteine

Tabelle 7.1: Liste mit Daten der verwendeten Proteine

Protein	Molekulargewicht in Dalton	Extinktionskoeffizient bei 280 nm [ $M^{-1}cm^{-1}$ ]	Isoelektrischer Punkt pI
Listeriolysin O (LLO)	56963	71850	7.21
GST-E <sub>8</sub> C-LLO	84975.9	118610	5.92
E <sub>8</sub> C-LLO	58827.5	71850	5.83
Fv (V <sub>H</sub> ) B3	14819.8	41160	9.57
Fv (V <sub>L</sub> ) B3	12413.1	13075	7.71
B3	27214.9	54235	n.a.
B3-LLO	86042.4	126085 <sup>1)</sup>	n.a.
MICA	32504.2	56295	6.67
MICA-E <sub>8</sub> C	33058.7	56295	5.63
B3-MICA	60273.6	110530 <sup>1)</sup>	n.a.
NKG2D	14579.5	41410	5.59

<sup>1)</sup> Summe der molaren Extinktionskoeffizienten der einzelnen Proteine (B3, E<sub>8</sub>C-LLO, MICA-E<sub>8</sub>C).

Sowohl die Werte für die molekularen Massen als auch für die Extinktionskoeffizienten der einzelnen Proteine berücksichtigen die gegebenenfalls vorhandenen Disulfidbrücken (Cystine). Molekulare Masse und Extinktionskoeffizient wurden mittels expasy ermittelt.

## 7.3 Sequenzen

Nachfolgend sind die Nukleotid-Sequenzen (NS) sowie Aminosäure-Sequenzen (AS) der in dieser Arbeit verwendeten Proteine LLO, E<sub>8</sub>C-LLO, MICA, MICA-E<sub>8</sub>C, NKG2D, B3-V<sub>H</sub>-R<sub>8</sub>CP aufgeführt. Für B3-V<sub>L</sub> ist lediglich die Aminosäure-Sequenz aufgeführt.

LLO (NS) ATGAAGGATGCATCTGCATTCAATAAAGAAAATTCAATTTTCATCCATGGCA  
 CCACCAGCATCTCCGCCTGCAAGTCCTAAGACGCCAATCGAAAAGAAACA  
 CGCGGATGAAATCGATAAGTATATACAAGGATTGGATTACAATAAAAACA  
 ATGTATTAGTATAACCACGGAGATGCAGTGACAAATGTGCCGCCAAGAAAA  
 GGTTACAAAGATGGAAATGAATATATTGTTGTGGAGAAAAAGAAGAAATC  
 CATCAATCAAATAATGCAGACATTCAAGTTGTGAATGCAATTTTCGAGCCT  
 AACCTATCCAGGTGCTCTCGTAAAAGCGAATTCGGAATTAGTAGAAAATC  
 AACCAGATGTTCTCCCTGTAAAACGTGATTCATTAACACTCAGCATTGATT  
 TGCCAGGTATGACTAATCAAGACAATAAAATAGTTGTAAAAAATGCCACT

AAATCAAACGTTAACAACGCAGTAAATACATTAGTGGAAGATGGAATGA  
 AAAATATGCTCAAGCTTATCCAAATGTAAGTGCAAAAATTGATTATGATGA  
 CGAAATGGCTTACAGTGAATCACAATTAATTGCGAAATTTGGTACAGCATT  
 TAAAGCTGTAAATAATAGCTTGAATGTAACTTCGGCGCAATCAGTGAAG  
 GGAAAATGCAAGAAGAAGTCATTAGTTTTAAACAAATTTACTATAACGTG  
 AATGTTAATGAACCTACAAGACCTTCCAGATTTTTCGGCAAAGCTGTTACT  
 AAAGAGCAGTTGCAAGCGCTTGGAGTGAATGCAGAAAATCCTCCTGCATA  
 TATCTCAAGTGTGGCGTATGGCCGTCAAGTTTATTTGAAATTATCAACTAA  
 TTCCCATAGTACTAAAGTAAAAGCTGCTTTTGATGCTGCCGTAAGCGGAAA  
 ATCTGTCTCAGGTGATGTAGAATAACAATATCATCAAAAATTCTTCCTT  
 CAAAGCCGTAATTTACGGAGGTTCCGCAAAGATGAAGTTCAAATCATCG  
 ACGGCAACCTCGGAGACTTACGCGATATTTTGAAAAAGGCGCTACTTTTA  
 ATCGAGAAACACCAGGAGTTCCATTGCTTATACAACAACTTCCTAAAA  
 GACAATGAATTAGCTGTTATTAATAACAACCTCAGAATATATTGAAACAAC  
 TTCAAAGCTTATACAGATGGAAAAATTAACATCGATCACTCTGGAGGAT  
 ACGTTGCTCAATCAACATTTCTTGGGATGAAGTAAATTATGATCCTGAAG  
 GTAACGAAATTGTTCAACATAAAAACCTGGAGCGAAAACAATAAAAGCAAG  
 CTAGCTCATTTACATCGTCCATCTATTTGCCTGGTAACGCGAGAAATATT  
 AATGTTTACGCTAAAGAATGCACTGGTTTAGCTTGGGAATGGTGGAGAAC  
 GGTAATTGATGACCGAACTTACCACTTGTGAAAAATAGAAATATCTCCAT  
 CTGGGGCACCACGCTTTATCCGAAATATAGTAATAAAGTAGATAATCCAAT  
 CGAACACCACCACCACCACCT

LLO (AS) MKDASAFNKENSISSMAPPASPPASPKTPIEKKHADEIDKYIQGLDYNKNNVL  
 VYHGDAVTNVPKRKYKDGNEYIVVEKKKKSINQNNADIQVNAISSLTPG  
 ALVKANSELVENQPDVLPVKRDSLTLSDLPGMTNQDNKIVVKNATKSNVNN  
 AVNTLVERWNEKYAQAYPNVSAKIDYDDEMAYSESQLIAKFGTAFKAVNNS  
 LNVNFGAISEGKMQEIVISFKQIYYNVNVNEPTRPSRFFGKAVTKEQLQALGV  
 NAENPPAYISSVAYGRQVYLKLSNSTHSTKVKAAFDAAVSGKSVSGDVELTNI  
 IKNSSFKAVIYGGSAKDEVQIIDGNLGLDRDILKKGATFNRETPGVPIAYTTNFL  
 KDNELAVIKNNSEYIETTSKAYTDGKINIDHSGGYVAQFNISWDEVNYDPEGN  
 EIVQHKNWSENNKSKLAHFTSSIYLPGNARNINVYAKECTGLAWEWWRVID  
 DRNLPLVKNRNISIWGTTLYPKYSNKVDNPIEHHHHHH

E<sub>8</sub>C-LLO (NS) TATCGGATCTGGTTCCGCGTGGATCCCCGGAATTCGAAGAGGAGGAAGAG  
 GAGGAGGAATGCGCTTCCGGAATGAAGGATGCATCTGCATTCAATAAAGA  
 AAATTCAATTTTCATCCATGGCACCACCAGCATCTCCGCTGCAAGTCCTAA  
 GACGCCAATCGAAAAGAAACACGCGGATGAAATCGATAAGTATATACAAG  
 GATTGGATTACAATAAAAACAATGTATTAGTATACCACGGAGATGCAGTG  
 ACAAATGTGCCGCAAGAAAAGGTTACAAAGATGGAAATGAATATATTGT  
 TGTGGAGAAAAAGAAGAAATCCATCAATCAAAAATAATGCAGACATTCAAG  
 TTGTGAATGCAATTTGAGCCTAACCTATCCAGGTGCTCTCGTAAAAGCGA  
 ATTCGGAATTAGTAGAAAATCAACCAGATGTTCTCCCTGTAAAACGTGATT  
 CATTAACTCAGCATTGATTTGCCAGGTATGACTAATCAAGACAATAAAA

TAGTTGTA AAAAATGCCACTAAATCAAACGTTAACAACGCAGTAAATACA  
 TTAGTGGAAGATGGAATGAAAAATATGCTCAAGCTTATCCAAATGTAAG  
 TGCAAAAATTGATTATGATGACGAAATGGCTTACAGTGAATCACAATTAAT  
 TGCGAAATTTGGTACAGCATTTAAAGCTGTAAATAATAGCTTGAATGTAAA  
 CTTCGGCGCAATCAGTGAAGGGAAAATGCAAGAAGAAGTCATTAGTTTTA  
 AACAAATTTACTATAACGTGAATGTTAATGAACCTACAAGACCTTCCAGAT  
 TTTTCGGCAAAGCTGTTACTAAAGAGCAGTTGCAAGCGCTTGGAGTGAATG  
 CAGAAAATCCTCCTGCATATATCTCAAGTGTGGCGTATGGCCGTCAAGTTT  
 ATTTGAAATTATCAACTAATCCCATAGTACTAAAGTAAAAGCTGCTTTTG  
 ATGCTGCCGTAAGCGGAAAATCTGTCTCAGGTGATGTAGAATAACAAT  
 ATCATCAAAAATTCTTCCTTCAAAGCCGTAATTTACGGAGGTTCCGCAAAA  
 GATGAAGTTCAAATCATCGACGGCAACCTCGGAGACTTACGCGATATTTTG  
 AAAAAAGGCGCTACTTTTAATCGAGAAACACCAGGAGTTCCCATTTGCTTAT  
 ACAACAACTTCTAAAAGACAATGAATTAGCTGTTATTA AAAACA ACTC  
 AGAATATATTGAAACA ACTTCAAAGCTTATACAGATGGAAAAATTAACA  
 TCGATCACTCTGGAGGATACGTTGCTCAATTCAACATTTCTTGGGATGAAG  
 TAAATTATGATCCTGAAGGTAACGAAATTGTTCAACATAAAA ACTGGAGC  
 GAAAACAATAAAAGCAAGCTAGCTCATTTCACATCGTCCATCTATTTGCCT  
 GGTAACGCGAGAAGTATTAATGTTTACGCTAAAGAATGCACTGGTTTAGCT  
 TGGAATGGTGGAGAACGGTAATTGATGACCGGAACTTACCACTTGTGAA  
 AAATAGAAATATCTCCATCTGGGGCACCACGCTTTATCCGAAATATAGTAA  
 TAAAGTAGATAATCCAATCGAACACCACCACCACCACCTAATAAAGG

E<sub>8</sub>C-LLO (AS) SDLVPRGSPEFE EEEEEEEECASGMKDASAFNKENSIS SMAPPASPPASPKTPIEK  
 KHADEIDKYIQGLDYNKNNVLVYHGDAVTNVPPRKG YKDGNEYIVVEK KKK  
 SINQNNADIQVVNAISSLTYPGALVKANSELVENQPDVLPVKRDSL TLSIDLPG  
 MTNQDNKIVVKNATKSNVNNVNTLVERWNEKYAQAYPNVSAKIDYDDEM  
 AYSESQLIAKFGTAFKAVNNSLNVNFGAISEGKMQE EVISFKQIYYNVNNEP  
 TRPSRFFGKAVTKEQLQALGVNAENPPAYISSVAYGRQVYLK LSTNSHSTKVK  
 AAFDAAVSGKSVSGDVELTNIKNSSFKA VIYGGSAKDEVQIIDGNLGDRLDIL  
 KKGATFNRETPGVPIAYTTNFLKDNELAVIKNNSEYIETTSKAYTDGKINIDHS  
 GGYVAQFNISWDEVNYDPEGNEIVQHKNWSENNKSKLAHFTSSIYLPGNARSI  
 NVYAKECTGLAWEWWRVVIDDRNLPLVKNRNISIWGTTLYPKYSNKVDNPIE  
 HHHHHH

MICA (NS) ATGGAGCCCCACAGTCTTCGTTATAACCTCACGGTGCTGTCCTGGGATGGA  
 TCTGTGCAGTCAGGGTTTCTCACTGAGGTACATCTGGATGGTCAGCCCTTC  
 CTGCGCTGTGACAGGCAGAAATGCAGGGCAAAGCCCCAGGGACAGTGGGC  
 AGAAGATGTCCTGGGAAATAAGACATGGGACAGAGAGACCAGAGACTTG  
 ACAGGGAACGGAAAGGACCTCAGGATGACCCTGGCTCATATCAAGGACCA  
 GAAAGAAGGCTTGCATTCCCTCCAGGAGATTAGGGTCTGTGAGATCCATG  
 AAGACAACAGCACCAGGAGCTCCAGCATTTCTACTACGATGGGGAGCTC  
 TTCCTCTCCCAAACCTGGAGACTAAGGAATGGACAATGCCCCAGTCCTCC  
 AGAGCTCAGACCTTGGCCATGAACGTCAGGAATTTCTTGAAGGAAGATGC

CATGAAGACCAAGACACACTATCACGCTATGCATGCAGACTGCCTGCAGG  
 AACTACGGCGATATCTAAAATCCGGCGTAGTCCTGAGGAGAACAGTGGCC  
 CCCATGGTGAATGTCACCCGCAGCGAGGCCTCAGAGGGCAACATTACCGT  
 GACATGCAGGGCTTCTGGCTTCTATCCCTGGAATATCACACTGAGCTGGCG  
 TCAGGATGGGGTATCTTTGAGCCACGACACCCAGCAGTGGGGGGATGTCC  
 TGCTGATGGGAATGGAACCTACCAGACCTGGGTGGCCACCAGGATTTGC  
 CAAGGAGAGGAGCAGAGGTTACCTGCTACATGGAACACAGCGGGAATCA  
 CAGCACTCACCTGTGCCCTCTCACCACCACCACCACCAC

MICA (AS) EPHSLRYNLTVLSWDGVSQSGFLTEVHLDGQPFLRCRDRQKCRAPQGQWAE  
 DVLGNKTWDRETRDLTGNGKDLRMTLAHIKDQKEGLHSLQEIRVCEIHEDNS  
 TRSSQHFYYDGELFLSQNLETKEWTMPQSSRAQTLAMNVRNFLKEDAMKTK  
 THYHAMHADCLQELRRYLKSGVVLRRTVPPMVNVTRSEASEGNITVTCRASG  
 FYPWNITLSWRQDGVSLSHDTQQWGDVLPDGNGTYQTWVATRICQGEEQR  
 TCYMEHSGNHSTHPVPSHHHHHH

MICA-E<sub>8</sub>C (NS) ATGGAGCCCCACAGTCTTCGTTATAACCTCACGGTGCTGTCCTGGGATGGA  
 TCTGTGCAGTCAGGGTTTCTCACTGAGGTACATCTGGATGGTCAGCCCTTC  
 CTGCGCTGTGACAGGCAGAAATGCAGGGCAAAGCCCCAGGGACAGTGGGC  
 AGAAGATGTCCTGGGAAATAAGACATGGGACAGAGAGACCAGAGACTTG  
 ACAGGGAACGGAAAGGACCTCAGGATGACCCTGGCTCATATCAAGGACCA  
 GAAAGAAGGCTTGCATTCCCTCCAGGAGATTAGGGTCTGTGAGATCCATG  
 AAGACAACAGCACCAGGAGCTCCCAGCATTCTACTACGATGGGGAGCTC  
 TTCCTCTCCCAAACCTGGAGACTAAGGAATGGACAATGCCCCAGTCCTCC  
 AGAGCTCAGACCTTGGCCATGAACGTCAGGAATTTCTTGAAGGAAGATGC  
 CATGAAGACCAAGACACACTATCACGCTATGCATGCAGACTGCCTGCAGG  
 AACTACGGCGATATCTAAAATCCGGCGTAGTCCTGAGGAGAACAGTGGCC  
 CCCATGGTGAATGTCACCCGCAGCGAGGCCTCAGAGGGCAACATTACCGT  
 GACATGCAGGGCTTCTGGCTTCTATCCCTGGAATATCACACTGAGCTGGCG  
 TCAGGATGGGGTATCTTTGAGCCACGACACCCAGCAGTGGGGGGATGTCC  
 TGCTGATGGGAATGGAACCTACCAGACCTGGGTGGCCACCAGGATTTGC  
 CAAGGAGAGGAGCAGAGGTTACCTGCTACATGGAACACAGCGGGAATCA  
 CAGCACTCACCTGTGCCCTCTGGATCCTGTGAAGAAGAAGAAGAAGAAG  
 AAGAGCCATGATAA

MICA-E<sub>8</sub>C (AS) MEPHSLRYNLTVLSWDGVSQSGFLTEVHLDGQPFLRCRDRQKCRAPQGQWA  
 EDVLGNKTWDRETRDLTGNGKDLRMTLAHIKDQKEGLHSLQEIRVCEIHEDN  
 STRSSQHFYYDGELFLSQNLETKEWTMPQSSRAQTLAMNVRNFLKEDAMKT  
 KTHYHAMHADCLQELRRYLKSGVVLRRTVPPMVNVTRSEASEGNITVTCRAS  
 GFYPWNITLSWRQDGVSLSHDTQQWGDVLPDGNGTYQTWVATRICQGEEQR  
 FTCYMEHSGNHSTHPVPSGSCEEEEEEEEP

NKG2D (NS) ATGACCGAAAGTTACTGTGGCCCATGTCCTAAAACTGGATATGTTACAAA  
 AATAACTGCTACCAATTTTTTGGATGAGAGTAAAACTGGTATGAGAGCCA

---

GGCTTCTTGTATGTCTCAAAATGCCAGCCTTCTGAAAGTATACAGCAAAGA  
GGACCAGGATTTACTTAAACTGGTGAAGTCATATCATTGGATGGGACTAGT  
ACACATTCCAACAAATGGATCTTGGCAGTGGGAAGATGGCTCCATTCTCTC  
ACCCAACCTACTAACAATAATTGAAATGCAGAAGGGAGACTGTGCACTCT  
ATGCCTCGAGCTTTAAAGGCTATATAGAAAACCTGTTCAACTCCAATAACGT  
ACATCTGCATGCAAAGGACTGTGTGATAG

NKG2D (AS) MTESYCGPCPKNWICYKNNCYQFFDESKNWYESQASCMSQNASLLKVYSKE  
DQDLLKLVKSYHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTIEMQKGDICALYA  
SSFKGYIENCSTPNTYICMQRTV

B3-V<sub>L</sub> (AS) MDVLMTQSPLSLPVSLGDQASISCRSSQIIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLI  
YKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPFTFGCG  
TKLEIK

B3-V<sub>H</sub>-R<sub>8</sub>CP (NS) ATGGATGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGG  
GTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAACCTCTGGATTCACTTTCAGTGACTATTAC  
ATGTATTGGGTTCCGAGACTCCAGAGAAGTGTCTCGAGTGGGTCCGATAC  
ATTAGTAATGATGATAGTTCCGCCGCTTATTCAGACACTGTAAAGGGCCGG  
TTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAGGAACACCCTCTACCTGCAAATGAGC  
CGTCTGAAGTCTGAGGACACAGCCATATATACTGCGCAAGAGGACTGGC  
CTGGGGAGCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTC  
CGCACGTCGTCGCCGTCGCCGCGTCGCTGCCCA

B3-V<sub>H</sub>-R<sub>8</sub>CP (AS) MDVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCATSGFTFSYMYWVRQTPEKCLEWVAY  
ISNDDSSAAYS DTVKGRFTISRDNARNTLYLQMSRLKSEDTAIYYCARGLAWG  
AWFAYWGQGLVTVSARRRRRRRCP

## 7.4 Abkürzungsverzeichnis und englische Begriffe

Ab	Antikörper
ADCC	<i>antibody-dependent cellular cytotoxicity</i>
ADEPT	<i>antibody-directed enzyme prodrug therapy</i>
ALFP	Antikörper-Ligand-Fusionsprotein
AML	akute myeloische Leukämie
<i>annealing</i>	Hybridisierung einzelsträngiger, komplementärer DNA-Fragmente
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
B3-V <sub>H</sub> -R <sub>8</sub> CP	schwere Kette des monoklonalen Antikörpers B3 mit C-terminaler R <sub>8</sub> CP - Fusion
B3-V <sub>L</sub>	leichte Kette des monoklonalen Antikörpers B3
B3-R <sub>8</sub> CP, B3	dsFv des monoklonalen Antikörpers B3 mit C-terminaler R <sub>8</sub> CP Fusion
B3-LLO	modulares Immuntoxin, bestehend aus B3-R <sub>8</sub> CP und E <sub>8</sub> C-LLO
B3-MICA	modulares Immunkonjugat, bestehend aus B3-R <sub>8</sub> CP und MICA-E <sub>8</sub> C
B3-PE38	modulares Immuntoxin, bestehend aus B3 und dem Toxin PE38
BFA	Brefeldin A
BiTE-Molekül	<i>bispecific T cell engager molecule</i>
bp	Basenpaare
BRB	Basis-Renaturierungspuffer
BSA	Rinderserumalbumin
bsAb	bispezifischer Antikörper
bzw.	beziehungsweise
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CD	Circulardichroismus
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CDC	<i>complement-dependent cytotoxicity</i>
CDCs	<i>cholesterol-dependent pore-forming cytolysins</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CDR	<i>complement determining region</i>
CLL	chronische lymphozytische Leukämie
<i>crosslinking</i>	Vernetzung
Cu <sup>2+</sup>	zweiwertige Kupferionen
CV	<i>column volume</i> , Säulenvolumen
Da	Dalton
DAP10	DNAX-aktivierendes Protein 10 kDa
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
Dio	3,3'-Dioctadecyloxycarbocyanin-perchlorat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA, pDNA	Desoxyribonukleinsäure, Plasmid-DNA

---

dNTP	Desoxynukleotid
dsFv	disulfidverbrücktes Fv-Fragment
dsFvB3	disulfidverbrücktes Fv-Fragment des monoklonalen Antikörpers B3
dsFvB3-PE38	Immuntoxin, bestehend aus dsFvB3 und dem Toxin PE38
dsDNA	doppelsträngige DNA
DT	<i>Diphtherie</i> Toxin
DTNB	5,5`-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)
DTT	Dithiothreitol
E <sub>8</sub> C-LLO	Listeriolysin O mit N-terminaler E <sub>8</sub> C-Fusion
E <sub>8</sub> C-LLOox	E <sub>8</sub> C-LLO, welches mit GSSG oxidiert wurde
E <sub>8</sub> C-LLOred	E <sub>8</sub> C-LLO, welches mit GSH reduziert wurde
EC <sub>50</sub> -Wert	Proteinkonzentration, bei der 50 % der Zellen noch leben
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EpCam	epitheliales Zelladhäsionsmolekül
ErbB	Rezeptor-Tyrosin-Kinase, exprimiert auf Krebszellen
ESI	Elektrospray-Ionisation
FACS	<i>fluorescence activated cell sorter</i>
FasL	Fas Ligand
FBS	fötales Kälberserum
Fc	zweite und dritte konstante Domäne eines Antikörpers
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
<i>feeding</i>	Zufütterung
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
Fv	variabiles Fragment eines Antikörpers
GD	Gangliosid
Gdm·HCl	Guanidiniumhydrochlorid
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor
GMP	<i>good manufacturing practice</i>
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
GST	<i>Glutathion-S-Transferase</i>
GST-E <sub>8</sub> C-LLO	Fusionsprotein aus GST und E <sub>8</sub> C-LLO
HCL	Haarzell-Leukämie
HER2/neu	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
HLA	humanes Leukozyten Antigen
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HS	Pferdeserum
IFN $\alpha,\beta,\gamma$	Interferon $\alpha,\beta,\gamma$
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G

---

---

IL	Interleukin
IL-2R	Interleukin-2 Rezeptor
<i>inclusion bodies</i>	Einschlusskörper
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid
kb, kbp	Kilobasen, Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KIR	<i>killer cell inhibitory immunoglobulin-like receptor</i>
<i>labeln</i>	markieren
LMB-7/9	genetisch fusioniertes <i>single chain</i> B3-PE38
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LLO	Listeriolysin O
LLOox	LLO, welches mit GSSG oxidiert wurde
LLOred	LLO, welches mit GSH reduziert wurde
LMW	<i>low molecular weight</i> Marker
mAb	monoklonaler Antikörper
MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation</i>
mAu	<i>milli absorption units</i>
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
MHC	<i>major histocompatibility</i>
MICA/B	<i>MHC class I related chain A/B</i>
MICA-E <sub>8</sub> C	MICA, welches C-terminal um das Fusionspeptid E <sub>8</sub> C verlängert wurde
MIP-1 $\beta$	Makrophagen-Inflammatorisches Protein-1 $\beta$
MWCO	<i>molecular weight cut off</i>
n	Anzahl
n. a.	nicht angegeben
n. b.	nicht bestimmbar
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NCR	<i>natural cytotoxicity receptor</i>
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NKG2D	<i>natural killer group 2 D</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
OD	optische Dichte
PDB	Protein Data Bank
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PE, PE38	<i>Pseudomonas</i> Exotoxin, trunkierte Variante des <i>P.</i> Exotoxin
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PFO	Perfringolysin O
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
<i>Primer</i>	einzelsträngiges Oligonukleotid mit freier 3'-OH-Gruppe

---

---

R <sub>6</sub> C-LLO	Listeriolysin O mit N-terminaler R <sub>6</sub> C-Fusion
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
scFv	<i>single chain Fv</i>
<i>screening</i>	Auswahlprüfung, Selektion
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulphat-Polyacrylamidgelelektrophorese
<i>shuffling</i>	Mischen
SOC-Medium	<i>super optimal broth (SOC)</i> -Medium mit Glukosezusatz
TAE	Tris Acetat EDTA
TAG72	Tumor-assoziiertes Glykoprotein 72
<i>target</i>	Ziel (Antigen oder Zelle)
<i>targeting</i>	spezifische Adressierung (eines Antigens oder einer Zelle)
TBT	<i>Tris buffered Tween</i>
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N`N`-Tetramethyl-Ethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAIL	TNF-abhängiger Apoptose induzierender Ligand
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
U	Units
u. a.	unter anderem
ULBP1/2	<i>UL16-binding protein 1/2</i>
USA	<i>United States of America</i>
UV/VIS	Ultraviolett/ <i>Visible</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
V <sub>H</sub>	schwere Kette eines Antikörpers
V <sub>H</sub> -R <sub>8</sub> CP	schwere Kette des B3-R <sub>8</sub> CP mit C-terminaler R <sub>8</sub> CP-Fusion
V <sub>L</sub>	leichte Kette eines Antikörpers
(v/v)	Volumenprozent
(w/v)	Masseprozent
WCR	<i>World Cancer Report</i>
wt	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel

## Publikationen und Poster

### Publikationen:

Bergelt, S., Frost, S., & Lilie, H. "Listeriolysin O as cytotoxic component of an immunotoxin."  
*Protein Sci.* 18 (2009), 1210-1220

### Poster:

Bergelt, S., Frost, S., & Lilie, H. "Listeriolysin O as cytotoxic component of an immunotoxin"  
Cambridge Healthtech Institute's sixth annual PEGS: the essential protein engineering summit (2010),  
Boston (USA)

Bergelt, S. & Lilie, H. "Recruitment of Natural Killer cells for the elimination of tumour cells"  
4<sup>th</sup> Fabisch-Symposium for Cancer Research and Molecular Cell Biology and 2<sup>nd</sup> Targeted Tumor Therapies  
(2009), Berlin

Bergelt, S., Frost, S., & Lilie, H. "Listeriolysin O as cytotoxic component of an immunotoxin"  
20. Faltertage (2008), Wittenberg

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich mich bisher weder mit dieser noch einer anderen Arbeit weder an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg noch einer anderen Einrichtung um die Erlangung eines akademischen Grades beworben habe. Ich versichere weiterhin, dass die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Benutzung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel erstellt wurde. Den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen sind als solche gekennzeichnet.

Halle (Saale), Juni 2010

Sabine Bergelt