

Zielgerichtete Eliminierung autoreaktiver B-Lymphozyten mithilfe Antigen-basierter Fusionsproteine

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der RWTH Aachen
University zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Naturwissenschaften
genehmigte Dissertation vorgelegt

von

Master of Science

Diana Klose (geb. Pickert)

aus Eisenach

Berichter: Universitätsprofessor Dr. Rainer Fischer
 Universitätsprofessor Dr. Jürgen Bernhagen

Tag der mündlichen Prüfung: 15.03.2017

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Universitätsbibliothek online verfügbar.

Zusammenfassung

Autoantikörper spielen nicht nur für die Diagnostik zahlreicher Autoimmunerkrankungen eine entscheidende Rolle, sondern haben häufig auch eine pathogenetische Bedeutung. Im Laufe der letzten Jahre sind B-Zell-depletierende Therapien mittels monoklonaler Antikörper in klinischen Studien bei Patienten mit unterschiedlichen Autoimmunerkrankungen eingesetzt worden. Allerdings wurden die hohen Erwartungen in Placebo-kontrollierten, randomisierten Studien, z.B. beim Systemischen Lupus Erythematoses (SLE), nicht erfüllt. Dennoch bildet die Antigen-spezifische Beeinflussung autoreaktiver B-Lymphozyten über ihren B-Zellrezeptor (BZR) die Basis für ein neuartiges Behandlungskonzept, welches die chronisch-entzündlichen Vorgänge bei Autoimmunerkrankungen deutlich reduzieren könnte.

Hierfür werden zytotoxisch wirksame Fusionsproteine eingesetzt, die aus einer zellspezifischen Zellbindedomäne (Autoantigenfragment) und einer Effektor-domäne (bakterielle Toxine oder humane Enzyme mit pro-apoptotischem Potential) bestehen. Die vorliegende Doktorarbeit wurde innerhalb des von der Deutschen Forschungsgemeinschaft geförderten Projekts „B-Target“ in enger Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Münster (Abteilung Rheumatologie und medizinische Immunologie) durchgeführt.

Ziel dieser Arbeit war es, ein Antigen-spezifisches Targeting von B-Lymphozyten unter Verwendung eines entsprechenden Modellantigens zu charakterisieren und die Technologie nachfolgend auf ein krankheitsrelevantes Autoantigen zu übertragen. Da entsprechend immunisierte Spender eine 0,1-0,2%ige Frequenz Tetanus-reaktiver Gedächtnis-B-Zellen im Blut aufweisen, wurde für die Machbarkeitsstudie als Modellantigen das bereits etablierte Tetanustoxin Fragment C (TTC) ausgewählt. Im ersten Teil der Arbeit wurden verschiedene TTC-basierte Fusionsproteine mittels prokaryotischer und eukaryotischer Expression hergestellt, gereinigt und abschließend *in vitro* charakterisiert. Eine spezifische Zellbindung der TTC-basierten Fusionsprotein und eine konzentrationsabhängige Toxizität des Fusionsproteins TTC-ETA' bestehend aus der gekürzten Version des bakteriellen Toxins *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A (ETA') konnte auf der TTC-reaktiver muriner Hybridomzelllinie 5E4 nachgewiesen werden. Weiterhin konnte eine zellspezifische Depletion *ex vivo* an frisch isolierten Antigen-reaktiven CD27⁺ Gedächtnis-B-Zellen dokumentiert werden.

Für die *in vitro*-Charakterisierung TTC-basierter Fusionsproteine mit der Serpin B9 resistenten humanen Effektor-domäne Granzym B (GrB R201K) und dem Mikrotubuli-assoziierten Protein Tau (MAPTau) wurde eine humane lymphozytische TTC-reaktive REH-Zelllinie mithilfe der Transposon-Technologie (NBE Therapeutics, Basel, CH) generiert und eingesetzt. Hierfür wurden die variablen Antikörperfragmente der schweren und leichten Kette des anti (α)-TTC Antikörpers aus der murinen Hybridomzelllinie 5E4 identifiziert und in Transposon-basierte Expressionsvektoren kloniert. Nach erfolgreicher Generierung und Anreicherung von TTC-reaktiven lymphozytischen REH-Zellen, wurden die humanen TTC-Fusionsproteine *in vitro* charakterisiert. Dabei konnte eine Antigen-

spezifische Zellbindung und Internalisierung der TTC-Fusionsproteine an TTC-reaktiven REH-Zellen dokumentiert werden. Im Vergleich zum TTC-MAPTau Protein wies das GrB(R201K)-TTC Protein eine spezifische konzentrationsabhängige Toxizität mit einer halbmaximalen effektiven Proteinkonzentration (EC_{50}) von $0,77 \pm 0,25$ nM auf und induzierte Apoptose in TTC-reaktiven REH-Zellen. Diese neuen Erkenntnisse zeigen die Verwendung des GrBs als Effektordomäne innerhalb Antigen-basierter Fusionsproteine für einen therapeutischen Ansatz bei Autoimmunerkrankungen auf.

Die im ersten Teil dieser Arbeit etablierten Methoden wurde anschließend auf die Verwendung eines pathorelevanten Autoantigens und die Entwicklung entsprechender Fusionsproteine translatiert. Dazu wurde die $\alpha 1$ -Kette des extrazellulären Matrixproteins Laminin als potentielle Zielstruktur verwendet. Die Laminin $\alpha 1$ -Kette enthält verschiedene Epitope, die von pathogenen autoreaktiven Antikörpern von SLE-Patienten erkannt werden. Es wurden Fusionsproteine mit verschiedenen Varianten des C-terminalen Bereiches der Laminin- $\alpha 1$ -Kette mit den Domänen LG 3-5 kloniert, mittels prokaryotischer bzw. eukaryotischer Expression produziert und gereinigt. Sowohl im Serum als auch im Urin von SLE-Patienten konnten erste Nachweise von anti-Laminin-Autoantikörper mittels ELISA Untersuchungen dokumentiert werden. Weiterhin konnten in Seren und Urinproben von K14-CD40 Ligand transgener Mäuse, welche spontan SLE-ähnliche Symptome entwickeln, Laminin-reaktive Autoantikörper detektiert werden. Diese ersten positiven Ergebnisse wiesen auf einen bestimmten Abschnitt der Laminin $\alpha 1$ -Kette als mögliches Zielepitop der Autoantikörper hin, sodass entsprechende Autoantigen-basierte zytotoxische Fusionsproteine generiert werden konnten.

Die im Rahmen dieser Arbeit etablierten Daten liefern wichtige Erkenntnisse für die zukünftige Weiterentwicklung Antigen-basierter Fusionsproteine mit zielzellspezifischer Zytotoxizität, die zur Eliminierung autoreaktiver B-Zell-Populationen und somit zur Reduktion chronischer Entzündungsprozesse beitragen können.

Summary

Autoantibodies play an important role in the diagnostic of autoimmune diseases and significantly contribute to disease pathogenesis. In the last years, several B-cell depletion strategies including monoclonal antibodies were used in clinical trials with patients of different autoimmune disorders. In case of systemic lupus erythematosus (SLE), the placebo-controlled randomized trials did not achieve the endpoints. Nevertheless, the antigen-specific modification of autoreactive B-lymphocytes via their specific B cell receptor (BCR) is the basis for a novel treatment approach of autoimmune diseases.

Therefore, fusion proteins build of a target-cell specific binding domain (autoantigen) recombinant fused to an effector domain, a bacterial toxin or a human pro-apoptotic enzyme, were used to eliminate the target cell population. The project was initially funded by the DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft) and carried out in close cooperation with the Münster University Hospital (Department of Rheumatology and Medical Immunology).

The major goal of the thesis was the targeting of antigen-specific B cells via their unique BCR by either using first a model antigen and second a disease-relevant autoantigen. To successfully develop an active fusion protein, an appropriate cell targeting domain had to be identified. For the proof-of-concept we chose the well-established model-antigen tetanus toxoid fragment C (TTC). Vaccinated individuals have a frequency of 0.1-0.2% TTC reactive memory B cells in the periphery. Different TTC-based fusion proteins were cloned and subsequently produced using prokaryotic or eukaryotic expression systems followed by *in vitro* characterization.

The specific targeting, binding and dose-dependent elimination of the recombinant fusion protein of TTC-ETA' was confirmed on the murine TTC-reactive hybridoma cell line 5E4 and on freshly isolated human antigen-specific CD27⁺ memory B cells.

Subsequently, TTC-based human cytolytic fusion proteins consisting of a human effector domain, the microtubule-associated protein Tau (MAPTau) or granzyme B (GrB) mutant (R201K) were generated. For the *in vitro* characterization of these TTC-based fusion proteins, a human lymphocytic cell line was necessary. Here, the Transpo-mAb® technology (NBE Therapeutics, Basel, CH), depending on transposon-based gene transfer, was used for the generation of a novel TTC-reactive REH cell line. Therefore, the variable fragments of the α -TTC antibody from the mouse hybridoma cell line 5E4 was rescued and cloned into the transposon-based expression vectors. After successful generation and enrichment of the TTC-reactive REH cell population the characterization of the TTC-based human cytolytic fusion proteins was performed. GrB(R201K) based human cytolytic fusion protein induced apoptosis in a dose-dependent manner with a half maximal effective concentration (EC_{50}) of $0,77 \pm 0,25$ nM in contrast to the MAPTau based fusion proteins. According to these results, the GrB(R201K) effector domain could be a promising candidate for the generation of human cytolytic fusion proteins for autoimmune diseases treatment.

In the next step, the established methods to generate cytotoxic fusion proteins were transferred on a SLE -relevant autoantigen using the laminin α 1-chain. Different protein variants of the C-terminal

laminin globular domains (LG3-5) of the laminin α 1-chain were produced using prokaryotic or eukaryotic expression systems, respectively. By *in vitro* analysis of the novel human laminin-fusion proteins autoantibodies against the laminin α 1-chain fragments could be detected in serum and urine samples of patients with SLE. Using the murine derived laminin-based fusion proteins anti-laminin autoantibodies could be detected in serum and urine samples of K14-CD40ligand (L) transgenic (tg) mice, which develop SLE-like symptoms. These results indicates that the laminin α 1-chain could be used for further *in vivo* studies or generation of cytotoxic fusion proteins.

In summary a new approach of the direct elimination of autoreactive B-lymphocytes using antigen-based fusion proteins was developed. Such novel antigen-based fusion proteins could be used for future development of tailor-made therapeutics in autoimmune diseases.

Wissenschaftliche Veröffentlichungen innerhalb des Promotionsprojekts

Klose D, Saunders U, Barth S, Fischer R, Jacobi AM, Nachreiner T. Novel fusion proteins for the antigen-specific staining and elimination of B cell receptor-positive cell populations demonstrated by a tetanus toxoid fragment C (TTC) model antigen. *BMC Biotechnology*, 2016; 16:18

Klose D, Woitok M, Niesen J, Beerli R, Grawunder U, Barth S, Fischer R, Fendel R and Nachreiner T. Generation of an artificial human B cell line test system using the Transpo-mAb® technology to evaluate the therapeutic efficacy of novel antigen-specific fusion proteins, submitted to PLOS ONE

Wissenschaftliche Veröffentlichungen außerhalb des Promotionsprojekts

Woitok M, **Klose D**, Niesen J, Richter W, Abbas M, Stein C, Fendel R, Bialon M, Püttmann C, Fischer R, Barth S, Kolberg K. The efficient elimination of solid tumor cells by EGFR-specific and HER2-specific scFv-SNAP fusion proteins conjugated to benzylguanine-modified auristatin F. *Cancer Lett*, 2016, 381, (2), p. 323–330

Mladenov R, Hristodorov D, Cremer C, Gresch G, Grieger E, Schenke L, **Klose D**, Amoury M, Woitok M, Jost E, Brümmendorf T, Fendel R, Fischer R, Stein C, Thepen T, Barth S. CD64-directed microtubule associated protein tau kills leukemic blasts ex vivo, *Oncotarget*, 2016, doi: 10.18632/oncotarget.11568

Woitok M, **Klose D**, DiFiore S, Richter W, Gresch G, Grieger E, Stein C, Barth S, Fischer R, Kolberg K, Niesen J, Comparison of mouse and human scFv-SNAP-auristatin F drug conjugates with potent activity against EGFR overexpressing solid tumor cells. submitted to *Journal of Immunotherapy*

Inhaltsverzeichnis

I	Einleitung.....	1
I.1	Systemischer Lupus Erythematoses (SLE).....	1
I.2	Eigenschaften autoreaktiver B-Lymphozyten.....	4
I.3	Therapieansätze zur SLE Behandlung.....	6
I.4	Antigen-spezifische Eliminierung autoreaktiver B-Zellen.....	9
I.5	Fusionsproteine für die Diagnostik.....	12
I.6	Machbarkeitsstudie mit Modellantigen.....	12
I.7	Herstellung einer TTC-reaktiven humanen lymphozytischer Zelllinie mithilfe der Transpo-mAb®-Technologie.....	13
II	Ziel der Arbeit.....	16
III	Material und Methoden.....	18
III.1	Material.....	18
III.1.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	18
III.1.2	Standards und Reaktionskits.....	18
III.1.3	Geräte- und Apparaturenliste.....	19
III.1.4	Puffer und Lösungen.....	20
III.1.5	Nährlösungen, Medien und Zusätze für die Kultivierung von Bakterien und eukaryotischer Zellen.....	22
III.1.6	Antikörper und Antikörperkonjugate.....	24
III.1.7	Bakterienstämme.....	24
III.1.8	Synthetische Oligonukleotide und Vektoren.....	25
III.1.9	Zelllinien.....	27
III.1.10	Benzylguanin (BG) -modifizierte Fluoreszenzfarbstoffe.....	28
III.2	Methoden.....	28
III.2.1	Molekularbiologisches Arbeiten.....	28
III.2.1.1	Präparation von Plasmid-DNA.....	28
III.2.1.2	Isolierung von mRNA und cDNA-Synthese.....	28
III.2.1.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Kolonie-PCR.....	29

III.2.1.4	Agarosegel-Elektrophorese	30
III.2.1.5	Restriktionsverdau von DNA-Fragmenten	30
III.2.1.6	Ligation von DNA-Fragmenten.....	30
III.2.1.7	Bestimmung der DNA-Konzentration.....	31
III.2.1.8	Herstellung von Hitzeschock-kompetenten Bakterien	31
III.2.1.9	Transformation von Plasmid-DNA in Hitzeschock-kompetente Bakterien	31
III.2.1.10	Sequenzierung von DNA.....	31
III.2.2	Kultivierung von eukaryotischen Zellen.....	31
III.2.3	Stimulierung muriner Hybridomzellen	32
III.2.4	Transfektion von HEK293T-Zellen	32
III.2.5	Transfektion von REH-Zellen.....	32
III.2.6	Zellsortierung	32
III.2.7	Isolierung von humanen B-Zellen.....	33
III.2.8	Reinigung und Analyse von rekombinanten Proteinen.....	34
III.2.8.1	Periplasmatische Proteinexpression in <i>E. coli</i>	34
III.2.8.2	Proteinreinigung mittels Immobilisierter-Metallionen- Austauschchromatographie (IMAC).....	34
III.2.8.3	SDS-PAA-Gelelektrophorese.....	35
III.2.8.4	Western Blot-Analyse	35
III.2.8.5	Bestimmung der Proteinkonzentration	35
III.2.9	Kopplung der SNAP Fusionsproteine mit BG-markierten Molekülen	36
III.2.10	Enterokinase Verdau	36
III.2.11	Granzym B-Substratassay	36
III.2.12	Bindungsaktivität der rekombinanten Fusionsproteine.....	36
III.2.13	Bindungsnachweis von Fusionsproteinen an humane B-Zellen.....	37
III.2.14	Bestimmung der Rezeptordichte auf der Zelloberfläche.....	37
III.2.15	Zellviabilitätsassay/Zellproliferationsassay	37
III.2.16	Apoptose-Assay mittels AnnexinV-Bindung.....	38
III.2.17	Enzyme-Linked Immuno Spot Assay (ELISpot)	38
III.2.18	Konfokalmikroskopie.....	38

III.2.19	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	39
III.2.20	Statistische Analysen und Auswertungen	40
III.2.21	Bildbearbeitung.....	40
IV	Ergebnisse	41
IV.1	Charakterisierung Antigen-basierter Fusionsproteine.....	41
IV.1.1	Herstellung und <i>in vitro</i> -Charakterisierung TTC-basierter Fusionsproteine	41
IV.1.2	<i>Ex vivo</i> -Charakterisierung TTC-basierter Proteine auf humanen Gedächtnis-B-Zellen	48
IV.2	Charakterisierung humaner Effektordomänen	50
IV.2.1	Herstellung und <i>in vitro</i> -Charakterisierung von GrB-TTC und TTC-MAPTau	51
IV.2.2	Generierung von TTC-reaktiven humanen lymphozytischen Zellen.....	53
IV.2.2.1	Klonierung der Transposase-basierten Expressionsvektoren	53
IV.2.2.2	Transfektion humaner lymphozytischer REH-Zellen und Anreicherung positiv transfizierter Zellen.....	54
IV.2.3	<i>In vitro</i> -Charakterisierung der TTC-basierten Fusionsproteine auf humanen TTC-reaktiven REH-Zellen.....	56
IV.2.3.1	Bindungsnachweis der rekombinanten TTC-basierten Fusionsproteine auf TTC-reaktiven REH-Zellen	57
IV.2.3.2	Internalisierungsverhalten des SNAP-TTC Proteins auf humanen TTC-reaktiven REH-Zellen.....	57
IV.2.3.3	Zytotoxizität der TTC-Fusionsprotein mit humanen Effektordomänen auf TTC-reaktive REH-Zellen	58
IV.3	Herstellung Autoantigen-basierter zytotoxischer Fusionsproteine	61
IV.3.1	Identifikation eines SLE-spezifischen Autoantigens	61
IV.3.2	Herstellung und <i>in vitro</i> -Charakterisierung von humanen Laminin α 1-basierten Fusionsproteinen	63
IV.3.3	Herstellung und <i>in vitro</i> -Charakterisierung muriner Laminin α 1-basierten Fusionsproteine	66
V	Diskussion.....	73
V.1	Charakterisierung TTC-basierter Fusionsproteine.....	74

spezifische Zellbindung und Internalisierung der TTC-Fusionsproteine an TTC-reaktiven REH-Zellen dokumentiert werden. Im Vergleich zum TTC-MAPTau Protein wies das GrB(R201K)-TTC Protein eine spezifische konzentrationsabhängige Toxizität mit einer halbmaximalen effektiven Proteinkonzentration (EC_{50}) von $0,77 \pm 0,25$ nM auf und induzierte Apoptose in TTC-reaktiven REH-Zellen. Diese neuen Erkenntnisse zeigen die Verwendung des GrBs als Effektordomäne innerhalb Antigen-basierter Fusionsproteine für einen therapeutischen Ansatz bei Autoimmunerkrankungen auf.

Die im ersten Teil dieser Arbeit etablierten Methoden wurde anschließend auf die Verwendung eines pathorelevanten Autoantigens und die Entwicklung entsprechender Fusionsproteine translatiert. Dazu wurde die $\alpha 1$ -Kette des extrazellulären Matrixproteins Laminin als potentielle Zielstruktur verwendet. Die Laminin $\alpha 1$ -Kette enthält verschiedene Epitope, die von pathogenen autoreaktiven Antikörpern von SLE-Patienten erkannt werden. Es wurden Fusionsproteine mit verschiedenen Varianten des C-terminalen Bereiches der Laminin- $\alpha 1$ -Kette mit den Domänen LG 3-5 kloniert, mittels prokaryotischer bzw. eukaryotischer Expression produziert und gereinigt. Sowohl im Serum als auch im Urin von SLE-Patienten konnten erste Nachweise von anti-Laminin-Autoantikörper mittels ELISA Untersuchungen dokumentiert werden. Weiterhin konnten in Seren und Urinproben von K14-CD40 Ligand transgener Mäuse, welche spontan SLE-ähnliche Symptome entwickeln, Laminin-reaktive Autoantikörper detektiert werden. Diese ersten positiven Ergebnisse wiesen auf einen bestimmten Abschnitt der Laminin $\alpha 1$ -Kette als mögliches Zielepitop der Autoantikörper hin, sodass entsprechende Autoantigen-basierte zytotoxische Fusionsproteine generiert werden konnten.

Die im Rahmen dieser Arbeit etablierten Daten liefern wichtige Erkenntnisse für die zukünftige Weiterentwicklung Antigen-basierter Fusionsproteine mit zielzellspezifischer Zytotoxizität, die zur Eliminierung autoreaktiver B-Zell-Populationen und somit zur Reduktion chronischer Entzündungsprozesse beitragen können.

I Einleitung

I.1 Systemischer Lupus Erythematoses (SLE)

Rheumatische Autoimmunerkrankungen (AIK) treten zu 5% in der Bevölkerung auf [1]. Als Auslöser werden verschiedene Umweltfaktoren (Tabakrauch, ultraviolette Strahlung), genetische und epigenetische Veranlagungen („Human Leukocyte Antigen“-Polymorphismen, DNA-Methylierung und Histon-Modifikationen), Infektionen (Eppstein-Barr Virus) sowie immunregulatorische Faktoren (Unregelmäßigkeiten in der B- und T-Zell Signalkaskade) diskutiert, jedoch ist nicht ein Faktor alleine für die Ausprägung einer Autoimmunerkrankung verantwortlich [1-5]. Autoimmunerkrankungen können durch bestimmte Veränderungen in der B-Zell-Entwicklung entstehen, wodurch die Sekretion von pathogenen Autoantikörpern und die Aktivierung von T-Zellen Entzündungsprozesse bis hin zu Organschädigungen hervorrufen [2]. Ein bewährtes diagnostisches Vorgehen bei Patienten zahlreicher AIK ist die Bestimmung von Autoantikörpern in Patientenseren. Unterschieden werden organspezifische und systemische AIK. Zu den organspezifischen AIK zählen z.B. der Diabetes mellitus Typ 1, die multiple Sklerose (MS) und die Hashimoto-Thyroiditis. Zu den systemischen AIK zählen unter anderem die rheumatoide Arthritis (RA), das Sjögren-Syndrom und der systemische Lupus Erythematoses (SLE) [2, 6]. Beim SLE handelt es sich um den Prototyp einer chronischen AIK mit Entzündungssymptomen, welche durch Interferonausschüttung und Komplementaktivierung, hervorgerufen und verstärkt durch Autoantigen/Autoantikörperkomplexe gekennzeichnet ist und eine Gewebeerstörung in multiplen Organen zur Folge hat [7, 8]. Mehr als 100 verschiedene Autoantikörper können beim SLE auftreten, die unter anderem gegen Zellkernkomponenten, Phospholipid-assoziierte Proteine, Endothelmembran-Komponenten und Fragmente des Komplementsystems gerichtet sein können [3, 7]. Für die Diagnose des SLE werden die Titer der anti-nukleären Antikörper (ANA) und anti-Doppelstrang (ds)-DNA Antikörper im Patienten-Serum bestimmt [3, 9, 10]. Dabei sind ANAs bereits detektierbar, bevor klinische Manifestationen zu erkennen sind. Durch die Vielzahl an möglichen Autoantikörpern und einen häufigen Wechsel zwischen Ausbruch und Remission tritt SLE klinisch sehr heterogen auf.

SLE ist gekennzeichnet durch eine fehlerhafte angeborene und adaptive Immunantwort. Durch gestörte Toleranz-Kontrollpunkte während der frühen B-Zellentwicklung entsteht eine höhere Anzahl an autoreaktiven, gereiften naiven B-Zellen, was das Risiko der Autoantikörpersynthese erhöht [11, 12]. Hierbei kann der Zusammenbruch von Toleranz-Kontrollpunkten durch das Auftreten bestimmter Infektionen (molekulare Mimikrie) sowie durch die Hyperstimulation anderer Immunzellen hervorgerufen werden. Alternativ können im Zuge der Keimzentrumsreaktion autoreaktive B-Zellen vom IgG Isotyp *de novo* generiert werden [13]. Charakteristisch weisen die SLE Patienten Hypergammaglobulinämie und Immunkomplex-Ablagerungen auf, sodass Gewebeschädigungen in Haut, Niere, Nervengewebe, Blutgefäßen und Lunge auftreten [2, 6, 14]. Besonders die Beteiligung der Nieren oder des zentralen Nervensystems stellen schwerwiegende SLE-Manifestationen dar [15].

Die SLE-Patienten weisen eine hohe Morbidität auf, welche vor allem durch eine häufig auftretende Niereninsuffizienz hervorgerufen wird. Im Zusammenhang mit Folge-Infektionen, Herz-Kreislaufkrankungen, Krebs sowie der aktiven SLE-Erkrankung selbst besteht ein drei- bis fünffach erhöhtes Sterberisiko gegenüber der gesunden Bevölkerung [4, 16]. Jedoch ist die Überlebensrate bei SLE-Patienten durch Fortschritte in der Diagnostik, Therapie und Rehabilitation von 50% in den 1950er Jahren auf mehr als 90% (2016) gestiegen [17, 18].

Die Lupusnephritis (LN) ist eine schwere Organ-Manifestation des SLE und tritt bei mehr als 70% der SLE-Patienten auf. LN ist gekennzeichnet durch anti-dsDNA-Antikörperproduktion (70-96% der Patienten) und entzündungsbedingte Schäden der glomerulären, vaskulären und tubulo-interstitiellen Strukturen der Niere [14, 19, 20]. Die glomeruläre Entzündungsprozesse basieren dabei auf Ablagerungen der Autoantikörper und Komplementfaktoren, sowie der Infiltration von neutrophilen Leukozyten. Die Entstehung der LN ist trotz intensiver Studien bislang nicht vollständig geklärt, jedoch werden aktuell zwei Hypothesen diskutiert. Die erste Hypothese besagt, dass sie entweder durch die direkte Bindung von Autoantikörpern an glomeruläre Antigene wie z.B. Kollagen, α -Actinin, Myosin oder Laminin entstehen kann. Unterstützt wird diese Hypothese durch den elektronenmikroskopischen Nachweis erhöhter Mengen an glomerulären extrazellulären Matrixproteinen während der Krankheitsphasen [21, 22]. Bei der zweiten Hypothese geht man von der Entstehung der LN durch die Ablagerung von Immunkomplexen aus, die sich in der Niere insbesondere in den Glomeruli ansammeln und Entzündungsprozesse auslösen. Durch die fehlerhafte Beseitigung der Immunkomplexe lagern sich Nukleosomen an extrazellulären Matrixproteinen oder der mesangialen Matrix an. Dies stimuliert in Verbindung mit Peptid-spezifischen $CD4^+$ T-Zellen die Differenzierung von spezifische B-Zellen zu Plasmazellen und somit die Ausschüttung von DNA-spezifischen Autoantikörpern. Diese sekretierten DNA-spezifischen Autoantikörper binden am freigesetztes Chromatin und sorgen somit für eine Ablagerung der Immunkomplexe an der glomerulären Basalmembran, was ein Nierenversagen zur Folge haben kann [21, 23-28]. Untersuchungen von LN-Patienten und LN-Mausmodellen zeigten, dass die anti-dsDNA Antikörper eine hohe Kreuzreaktivität mit glomeruläre Proteinen wie z.B. α -Actinin und Laminin aufweisen, wodurch direkte Entzündungsreaktionen und nachfolgende Organschädigungen auftreten können [23, 24, 29-31]. In einer Reihe von Studien mit SLE/LN-Patienten sowie entsprechenden Mausmodellen sind Autoantikörper gegen das extrazelluläre Matrixprotein Laminin nachgewiesen worden [26, 29, 32-35].

Laminine sind heterotrimere Glykoproteine bestehend aus jeweils einer α , β und γ Kette, die zusammen eine Kreuz-ähnliche Struktur formen (Abbildung 1). Es wurden 5 α ($\alpha 1-5$), 3 β ($\beta 1-3$) und 3 γ ($\gamma 1-3$) Ketten identifiziert, die insgesamt 15 Isoformen bilden. Diese Isoformen sind gewebe- und Entwicklungsstadien-spezifisch [36-38]. Laminine haben verschiedene biologische Funktionen, z.B. sind diese an der Zelladhäsion, -Migration, -Wachstum und -Differenzierung, aber auch an der Tumor-Metastasenbildung und Angiogenese beteiligt [37]. Diese zellulären Funktionen werden durch die

Bindung an z.B. Integrin, α -Dystroglycan und Syndecan gefördert. Dabei sind die meisten Zellbindedomänen in den „G-like“ Domänen des Laminins der α 1-Kette lokalisiert [36, 37].

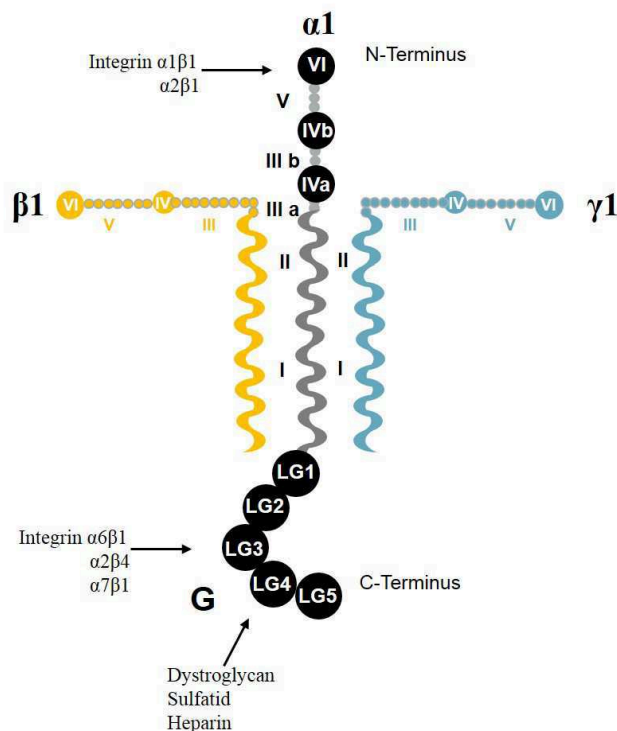


Abbildung 1: Schematische Struktur des extrazellulären Matrixproteins Laminin-1.

Das Glykoprotein Laminin-1 setzt sich aus den α 1, β 1 und γ 1-Ketten zusammen. Globuläre Domänen sind als Kreise und Bindungsstellen zur extrazellulären Matrix oder Zelloberflächenkomponenten sind mit Pfeilen dargestellt. Die α 1-Kette weist C-terminal Laminin G-like (LG) Domänen 1-5 auf. Die Abbildung wurde modifiziert nach [36-38].

Bei einer gesunden Nierenentwicklung wird das Laminin-1 durch das Laminin-11 ersetzt. Im Gegensatz dazu kommt es bei der LN zur Anhäufung von Laminin-1 in den subepithelialen und subendothelialen Bereichen und somit zur Entstehung von Antikörperablagerungen und Proteinurie [21, 22, 26]. In den glomerulären Endothelzellen und den Podozyten ist zusätzlich eine erhöhte Laminin-1 Expression nachgewiesen worden, sodass es zur Präsentation der Epitope der anti-Laminin-1 Autoantikörper kommt. Durch die Bindung der anti-Laminin-1 Autoantikörper an der glomerulären Basalmembran ist mit einer verstärkten Entzündungsreaktion zu rechnen, was eine mögliche Pathogenese-Relevanz des Laminin-1 als Autoantigen vermuten lässt. Identifikationsstudien autoreaktiver anti-Laminin-1 Antikörper beschränken sich auf α , β , γ Ketten des Laminins, ohne dass einzelne Bereiche auf exakte Epitope hin analysiert wurden [26, 39]. Nur die Arbeitsgruppe Naparstek (Universitätsklinikum Hadassah, Jerusalem, Israel) hat mit synthetischen Peptidsequenzen die Affinität von SLE-relevanten Laminin-1 Autoantikörpern gegenüber der Laminin α 1-Kette (LAMA1) untersucht [32, 40]. Hier konnte eine Peptidsequenz von 21 Aminosäuren, welche als VRT101 bezeichnet wurde, als Hauptepitop identifiziert werden. Die VRT101 Epitop Sequenz

(KEGYKVQSDVNITLERTSSQ) befindet sich innerhalb der LG5 Domäne der Laminin $\alpha 1$ -Kette (Abbildung 1). Sowohl Autoantikörper aus SLE-Patienten Seren als auch Autoantikörper in Mausmodellen mit SLE-ähnlichen Symptomen erkannten in dieser Studie diese Peptidsequenz und der Antikörpertiter korrelierte stark mit der Krankheitsausprägung [32, 40]. Im nächsten Schritt wurde das VRT101-Peptid an eine Sepahrose Matrix gekoppelt und als Affinitätssäule verwendet. Dabei konnte eine effiziente Reduzierung von anti-VRT101 Antikörper aus dem Serum von SLE-Patienten nachgewiesen werden, sodass die Entwicklung einer Plasmapherese mit Laminin-gekoppelten Matrixmaterial vorgeschlagen wurde [32, 40].

Ein Mausmodell, welches die Untersuchung autoreaktiver Laminin-Antikörper erlaubt, ist das transgene K14-CD40L Modell. Bei diesen transgenen Tieren wird der CD40-Ligand (CD40L) unter der Kontrolle des Keratin-14 Promoters in der Epidermis überexprimiert [41]. Dies führt zu einer kontinuierlichen Aktivierung von epidermalen antigen-präsentierenden Zellen (dendritischen Zellen), zur Differenzierung pathogener Effektor-T-Zellen und somit zum Zusammenbruch der Selbsttoleranz [41]. Diese Mäuse bilden ab einem Alter von 2-3 Monaten SLE-ähnliche Symptome aus, zu denen das Auftreten von hohen Autoantikörperkonzentrationen, das Vorhandensein von CD8⁺ T-Zellen und aktivierten B-Zellen, sowie die Ausbildung einer Glomerulonephritis mit Proteinurie gehören. Weiterhin tritt eine Dermatitis an Schnauze und Ohren auf [42, 43]. Dieses Mausmodell bietet gegen über humanen Studien den Vorteil Entstehung und Lokalisierung bzw. Akkumulierung der anti-Laminin Antikörper in den unterschiedlichen Geweben (Lymphknoten, Milz, Haut, Nieren) und zu den verschiedenen Zeitpunkten (vor, während und nach Krankheitsausbruch) untersuchen zu können. Jedoch kann nicht unmittelbar bei guten Erfolgen im Mausmodell auf vergleichbare Erfolge bei der Anwendung am Menschen geschlossen werden, da die Ausbildung und der Krankheitsverlauf des SLE sehr heterogen beim Menschen auftritt und somit ein transgenes Mausmodell nur einen Teil der im Patienten vorhandenen pathogenen Faktoren widerspiegelt. Mit Mausmodellen können jedoch erste Wirksamkeitsstudien von neu-entwickelten therapeutischen Ansätzen im Gesamtorganismus durchgeführt werden. Sie dienen zum anderen auch zur Bestimmung von maximalen Dosis potentieller neuer Therapeutika [44].

I.2 Eigenschaften autoreaktiver B-Lymphozyten

B-Lymphozyten regulieren die Immunantwort und Entwicklung des Immunsystems. Hierbei, sind die B-Zellen nicht nur für die Produktion von Antikörpern (natürliche, adaptive oder auto) verantwortlich, sondern nehmen über die Zytokinproduktion Einfluss auf Modifikationen (Aktivierung/Differenzierung) der T- und dendritischen Zellen [45, 46]. Im Falle einer Autoimmunerkrankung entsteht eine positive Feedback Schleife innerhalb der Toleranzkontrollpunkte während der B-Zellreifung, sodass unerwünschte autoreaktive B-Zellen nicht entfernt werden. Diese defekten Toleranzpunkte sind durch abnormale klonale Deletion und fehlerhaftes Rezeptorediting gekennzeichnet, sodass z.B. bei SLE-Patienten eine erhöhte Anzahl autoreaktiver Vorläufer B-Zellen

Summary

Autoantibodies play an important role in the diagnostic of autoimmune diseases and significantly contribute to disease pathogenesis. In the last years, several B-cell depletion strategies including monoclonal antibodies were used in clinical trials with patients of different autoimmune disorders. In case of systemic lupus erythematosus (SLE), the placebo-controlled randomized trials did not achieve the endpoints. Nevertheless, the antigen-specific modification of autoreactive B-lymphocytes via their specific B cell receptor (BCR) is the basis for a novel treatment approach of autoimmune diseases.

Therefore, fusion proteins build of a target-cell specific binding domain (autoantigen) recombinant fused to an effector domain, a bacterial toxin or a human pro-apoptotic enzyme, were used to eliminate the target cell population. The project was initially funded by the DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft) and carried out in close cooperation with the Münster University Hospital (Department of Rheumatology and Medical Immunology).

The major goal of the thesis was the targeting of antigen-specific B cells via their unique BCR by either using first a model antigen and second a disease-relevant autoantigen. To successfully develop an active fusion protein, an appropriate cell targeting domain had to be identified. For the proof-of-concept we chose the well-established model-antigen tetanus toxoid fragment C (TTC). Vaccinated individuals have a frequency of 0.1-0.2% TTC reactive memory B cells in the periphery. Different TTC-based fusion proteins were cloned and subsequently produced using prokaryotic or eukaryotic expression systems followed by *in vitro* characterization.

The specific targeting, binding and dose-dependent elimination of the recombinant fusion protein of TTC-ETA' was confirmed on the murine TTC-reactive hybridoma cell line 5E4 and on freshly isolated human antigen-specific CD27⁺ memory B cells.

Subsequently, TTC-based human cytolytic fusion proteins consisting of a human effector domain, the microtubule-associated protein Tau (MAPTau) or granzyme B (GrB) mutant (R201K) were generated. For the *in vitro* characterization of these TTC-based fusion proteins, a human lymphocytic cell line was necessary. Here, the Transpo-mAb® technology (NBE Therapeutics, Basel, CH), depending on transposon-based gene transfer, was used for the generation of a novel TTC-reactive REH cell line. Therefore, the variable fragments of the α -TTC antibody from the mouse hybridoma cell line 5E4 was rescued and cloned into the transposon-based expression vectors. After successful generation and enrichment of the TTC-reactive REH cell population the characterization of the TTC-based human cytolytic fusion proteins was performed. GrB(R201K) based human cytolytic fusion protein induced apoptosis in a dose-dependent manner with a half maximal effective concentration (EC_{50}) of $0,77 \pm 0,25$ nM in contrast to the MAPTau based fusion proteins. According to these results, the GrB(R201K) effector domain could be a promising candidate for the generation of human cytolytic fusion proteins for autoimmune diseases treatment.

In the next step, the established methods to generate cytotoxic fusion proteins were transferred on a SLE -relevant autoantigen using the laminin α 1-chain. Different protein variants of the C-terminal

Rezeptor [48, 51]. Einige B-Zell-Subpopulationen, wie z.B. CD27⁺IgD⁻CD95⁺CD10⁻ Gedächtnis-B-Zellen mit aktiviertem Phänotyp und CD27⁺⁺CD20⁻CD38⁺⁺HLA-DR^{high} Plasmablasten stehen im Zusammenhang mit der Krankheitsaktivität und dem anti-dsDNA Antikörpertiter bei SLE-Patienten [50, 52-54]. Weiterhin ist die Subpopulation der IgM⁺CD27⁺IgD^{+/-}CD38⁻ Gedächtnis-B-Zellen aufgrund des beschleunigten Klassenwechsels vermindert [55].

I.3 Therapieansätze zur SLE Behandlung

Aktuell existieren verschiedene Therapieansätze, die zur Behandlung des SLE eingesetzt werden. Standardisiert werden Immunsuppressiva oder immunmodulierende Substanzen zur Herstellung der immunologischen Homöostase und der Unterdrückung der Immunantwort eingesetzt [2, 56]. Hierzu zählt das Antimalariamittel Hydroxychloroquin, welches die „Toll-like“ Rezeptor (TLR) - Aktivierung inhibiert und somit zur Reduktion der Interferon alpha (INF- α) Freisetzung führt [57, 58]. Hydroxychloroquin übt einen Effekt auf a) akute Entzündungen durch z.B. Inhibierung der Histaminwirkung, b) chronische Entzündungsreaktionen durch Reduzierung der Lymphozytenproliferation oder der Zytokinproduktion sowie c) weitere zelluläre Funktionen aus [57]. Kortikosteroide, wie Glukokortikoide werden hauptsächlich zu Beginn der SLE Erkrankung verabreicht. Glukokortikoide inhibieren die B- und T-Zell Immunantwort und die damit verbundenen Effektorfunktionen auf Monozyten und Neutrophile, da sie die Aktivität des Transkriptionsfaktors Nuklearfaktor-kappaB (NF- κ B) hemmen [59]. Weitere Immunsuppressiva sind Cyclophosphamid (CTX) und Mycophenolat Mofetil (MMF), wobei das MMF ein Inhibitor der Purinsynthese ist und somit die Proliferation aktivierter B- und T-Zellen blockiert. Azathioprine (AZA) ist ein Purinanalogen, welches eine wichtige Rolle bei der Behandlung des SLE einnimmt. Dieses Immunsuppressivum wird im Lebergewebe und den Erythrozyten in Mercaptopurin umgesetzt, welches die DNA-Synthese hemmt und die Proliferation der Immunzellen stoppt [59]. DNA- und auch RNA-Synthese werden auch durch Methotrexat (MTX) inhibiert. MTX ist ein Folsäure-Analogen und somit ein kompetitiver Inhibitor der Dihydrofolatreduktase, das die Nukleinsäuresynthese inhibiert [59]. Dosis und Therapieintervalle der entzündungshemmenden Substanzen sind Gegenstand aktueller Studien, mit dem Ziel durch eine optimale Therapie möglichen End-Organschäden vorzubeugen [60]. Jedoch erweisen sich einige B-Zell-Subpopulationen nur eingeschränkt sensibel auf herkömmliche Therapien. So fanden sich beispielsweise nach einer drei bis sechs-monatigen Cyclophosphamid-Bolus-Therapie bei SLE-Patienten weiterhin erhöhte Frequenzen und stabile Zahlen CD27⁺ Gedächtnis-B-Zellen [61].

Hinzu kommt, dass die Verwendung von Immunmodulatoren und Immunsuppressiva einen systemischen Effekt auf das Immunsystem ausüben und sowohl pathogene als auch fremdantigen-spezifische Immunzellen ausschalten. Neuere Therapieansätze sind auf eine gezielte Eliminierung der pathogenen Immunzellen fokussiert. Zum Einsatz kommen dabei rekombinante monoklonale

Antikörper. Die Wirkweise dieser monoklonalen Antikörper kann in vier Gruppen unterteilt werden: 1) Ligand Blockierung, 2) Rezeptor Blockierung und Rezeptormodulation, 3) Erniedrigung des Zielrezeptors auf der Zelloberfläche und 4) Depletion antigenpräsentierender Zellen [10, 62]. Weiterhin können B-Zell gerichtete Wirksubstanzen für die Behandlung von Autoimmunerkrankungen in fünf Klassen unterteilt werden (Tabelle 1).

Tabelle 1: Mechanismen der zielgerichteten B-Zell-Beeinflussung, modifiziert nach [2, 59]

Klasse	Mechanismus
1	Blockierung von B-Zellen mithilfe mAk (anti-CD19, -CD20, -CD22)
2	Neutralisierung der Überlebensfaktoren BAFF und APRIL
3	Substanzen, die über den B-Zellrezeptor (BZR) oder über BZR-assozierte Transmembran-Signalproteine wie z.B. CD79 Apoptose induzieren
4	Ablösen der gebildeten "ectopic germinal center" durch Antikörper gegen den Lymphotoxin- β -Rezeptor
5	Inhibition der Zytokine durch Antikörper gegen Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF- α), IL-1, IL-6, IL-10, IL-15 und IL-18

Für die direkte B-Zellblockierung wurden verschiedene Antikörper (humane, chimäre) entwickelt, welche eine Reaktivität gegen CD19, CD20, CD22 oder die B-Zell-Überlebensfaktoren BAFF und APRIL aufweisen [4, 59, 62].

Rituximab ist ein anti-CD20 chimärer (human/muriner) monoklonaler Antikörper. 1997 wurde dieser zunächst für die Behandlung von B-Lymphomen von der „Food and Drug Administration“ (FDA) zugelassen [59]. Der CD20-Rezeptor wird auf prä-B-Zellen sowie reifen B-Zellen exprimiert, jedoch nicht auf den Plasmazellen. Dabei wirkt dieser monoklonale Antikörper über die Antikörper-abhängige, zellvermittelnde Zytotoxizität (ADCC) sowie die Komplement-vermittelte Zellyse und Apoptose [59]. Im Gegensatz zu dem erfolgreichen Einsatz bei RA-Patienten konnten in den klinischen Studien der Phase III (EXPLORER und LUNAR) für SLE-Patienten die festgelegten primären Endpunkte nicht erreicht werden [15, 62]. Bei der vollständig humanisierten Variante des monoklonalen anti-CD20 Antikörpers, dem Ocrelizumab, wurden die klinischen Studien der Phase III aufgrund von erhöhten Infektionsraten frühzeitig abgebrochen [15].

Ursprünglich für die Behandlung von B-Zell Malignitäten entwickelt worden ist Epratuzumab, ein vollständig humaner monoklonaler Antikörper gegen den CD22-Rezeptor [15]. Der CD22-Rezeptor befindet sich im Zytoplasma unreifer B-Zellen und wird nach Reifung auf der Oberfläche von z.B. Gedächtnis-B-Zellen und Plasmazellen exprimiert [15, 18]. Epratuzumab bewirkt eine schnelle Internalisierung des CD22-Rezeptors, welches eine Phosphorylierungssignalkaskade auslöst, die damit endet, dass Bestandteile des BZR-Komplexes wie CD19, CD79 β und CD21 von der Zelloberfläche

entfernt werden. Epratuzumab erzielt dadurch inhibitorische Effekte auf CD27⁻ naiven B-Zellen sowie auf CD27⁺ Gedächtnis-B-Zellen [15]. Allerdings verfehlte auch dieser monoklonale Antikörper in den Phase III-Studien die primären Endpunkte.

Belimumab ist ein humaner monoklonaler IgG1-Antikörper, der die lösliche Form des B-Lymphozyten-stimulierender Faktors BLYS/BAFF bindet und dessen Aktivität inhibiert [15, 18, 62]. BLYS ist ein zentrales Zytokin, welches für das Überleben, die Proliferation, die Aktivierung und Reifung von B-Zellen eine Rolle spielt und zur Tumor-Nekrose (TNF)-Familie gehört [18]. Belimumab ist 2011 für die Behandlung therapierefraktärer SLE-Patienten mit Hinweisen für eine serologische Aktivität von der FDA und der Europäischen Arzneimittelagentur (EMA) zugelassen worden. Vorteile der Therapie mit Belimumab sind insbesondere die Verhinderung schwerer Schübe unter gleichzeitiger Einsparung von Glykokortikoiden und die damit einhergehende langfristige gute Verträglichkeit [63], da eine längere Verabreichung von Glykokortikoiden mit erhöhten Nebenwirkungsrate und gleichzeitiger erhöhter Mortalität verbunden ist. Zurzeit wird eine klinische Studie mit Belimumab (BLISS-LN) an Lupusnephritis Patienten durchgeführt [17]. Gleichzeitig wird auch eine Kombinationstherapie mit initialer Rituximab-Verabreichung und anschließender Belimumab-Gabe in klinischen Studien getestet [18, 64]. Im Gegensatz zu Belimumab erreichte Tabalumab, ein humanisierter mAk gegen die lösliche und membrangebundene Form des BLYS, nicht die primären Endpunkte in der klinischen Phase II Studie [64].

Neben den beschriebenen monoklonalen Antikörpern werden auch bereits rekombinante Fusionsproteine, wie das Blisibimod (A-623) in klinischen Studien analysiert. Blisibimod besteht aus dem Fc-Teil des IgG Antikörpers und vier BAFF-Bindungsdomänen (Peptide), welche selektiv an BLYS binden [64]. Eine Phase II/III-Studie an SLE-Patienten mit mittlerem bis schwerem Erkrankungsgrad wird aktuell durchgeführt. Eine reduzierte Proteinurie, eine gestiegene Anzahl an B-Zellen sowie eine Wiederherstellung des Serumlevels des Komplementfaktors C3 und eine Verminderung des ds-DNA Antikörpertiters konnten bereits beobachtet werden [48].

Atacicept ist ein rekombinantes Fusionsprotein bestehend aus einem Teil des TACI-Rezeptors, welcher an BLYS und APRIL („a proliferation-inducing ligand“, B-Zellüberlebensfaktor) bindet, fusioniert mit einem Fc-Teil des IgG Antikörpers. Durch die Blockierung der Rezeptoren von BLYS und APRIL wird die Interaktion dieser proliferationsfördernden Substanzen inhibiert. Somit blockiert Atacicept die B-Zell-Reifung hin zu Plasmazellen und das Überleben [18]. Dadurch kommt es zur Verminderung der peripheren B-Zellen und zum relativen Anstieg der Gedächtnis-B-Zellen, ähnlich wie bei Belimumab.

Die positiven Ergebnisse der Blisibimod Studien und die Zulassung von Belimumab zeigen, dass das Konzept der B-Zell-gerichteten Therapien erfolgreiche Ansätze zur Behandlung von SLE-Patienten bieten kann. Die starke Heterogenität der Patienten sowie der aus ethischen Gründen gewählte kombinierte Einsatz etablierter und experimenteller Substanzen erschwert jedoch das Sichtbarwerden

des Effektes B-Zell-beeinflussender Substanzen in klinischen Studien. Außerdem lösen auch diese Therapiestrategien nicht das Problem der nur eingeschränkten Erreichbarkeit autoreaktiver antigen-erfahrener B-Zellen.

I.4 Antigen-spezifische Eliminierung autoreaktiver B-Zellen

Eine alternative Variante als zielgerichteter Therapieansatz ist das spezifische Targeting und die Eliminierung autoreaktiver B-Zellen über ihren einzigartigen B-Zell-Rezeptor. Hierfür werden Fusionsprotein mit Zellbindedomäne, ein relevantes Peptidfragment des Autoantigens, und Effektdomänen eingesetzt. Dieser Ansatz basiert auf der Verwendung von Immuntoxinen aus dem Bereich der Krebsdiagnostik und -therapie [65]. Dieses Konzept der zielgerichteten Therapie wurde schon von Paul Ehrlich in den frühen 1900er Jahren entwickelt [66, 67]. In den letzten Jahrzehnten wurde dieser Ansatz weiterentwickelt, sodass nun nicht nur monoklonale Antikörper als Zellbindedomäne eingesetzt werden, sondern auch Teilfragmente von monoklonalen Antikörpern wie variable Fragmente („single chain“ scFv), Antigen-Bindungsfragmente $F(ab)_2$ oder Rezeptoren und Liganden [65, 67, 68]. Als zytotoxische Domäne innerhalb der Immuntoxine werden bakterielle Toxine, wie das *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A (ETA), Diphtheria Toxin A oder pflanzliche Toxine, wie das Rizin und Gelonin verwendet [67, 69]. Zunächst wurden bei Immuntoxinen die Zellbindungseinheiten mit der toxischen Domäne über chemische Kopplung wie z.B. Disulfidbrücken, Peptidbindungen oder Thioetherbindungen verbunden. Nach Weiterentwicklungen der Immuntoxine wurden die Verbindung der zwei Domänen nun rekombinant durch genetische Fusionen erreicht [70, 71]. Bei rekombinanten Immuntoxinen wird die Zellbindungsdomäne des bakteriellen Toxins, wie im Fall des ETAs (Domäne Ia und Ib) durch die gewünschten Antikörper-Fragmente oder anderen Liganden ersetzt [67, 71, 72]. Für die zielgerichtete Therapie mittels Immuntoxinen ist die Unterscheidung zwischen gesunder und krankhafter Zellen entscheidend, um unspezifische Toxizität an gesunden Zellen zu vermeiden. Bei der Verwendung des Prinzips der Immuntoxine für das zielgerichtete Targeting und die Eliminierung von B-Lymphozyten kann über die spezifische Bindung des Antigens an dem BZR eine effiziente Zellbindung erreicht werden.

Folgende Eigenschaften sollten effiziente Immuntoxine aufweisen: 1) spezifische Zellbindung an die Zielzellen, 2) schnelle Rezeptor-vermittelte Internalisierung und Transport über die Endosomen zum Golgi-Apparat hin zum endoplasmatischen Retikulum (ER), 3) Abspaltung und Freisetzung der toxischen Domäne aus dem ER ins Zytoplasma (Abbildung 3). ETA als toxische Domäne kann über zwei Wirkmechanismen Apoptose in den Zielzellen induzieren. Zum einen wird durch Adenosin 5'-Diphosphat die (ADP)-Ribosylierung des Elongationsfaktors 2 herbeigeführt, was zum Anhalten der Proteinsynthese und nachfolgend zur Apoptose der Zelle führt [67, 71, 73]. Zum anderen kann es auch über die Aktivierung von Caspasen, insbesondere der Caspase-3 die Spaltung des Reparaturenzyms poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) katalysieren und den programmierten Zelltod verursachen

[74, 75]. Für die Translokation der ETA-Domäne in das Zytosol der Zielzelle ist C-terminal die Aminosäure-Sequenz REDLK notwendig [76].

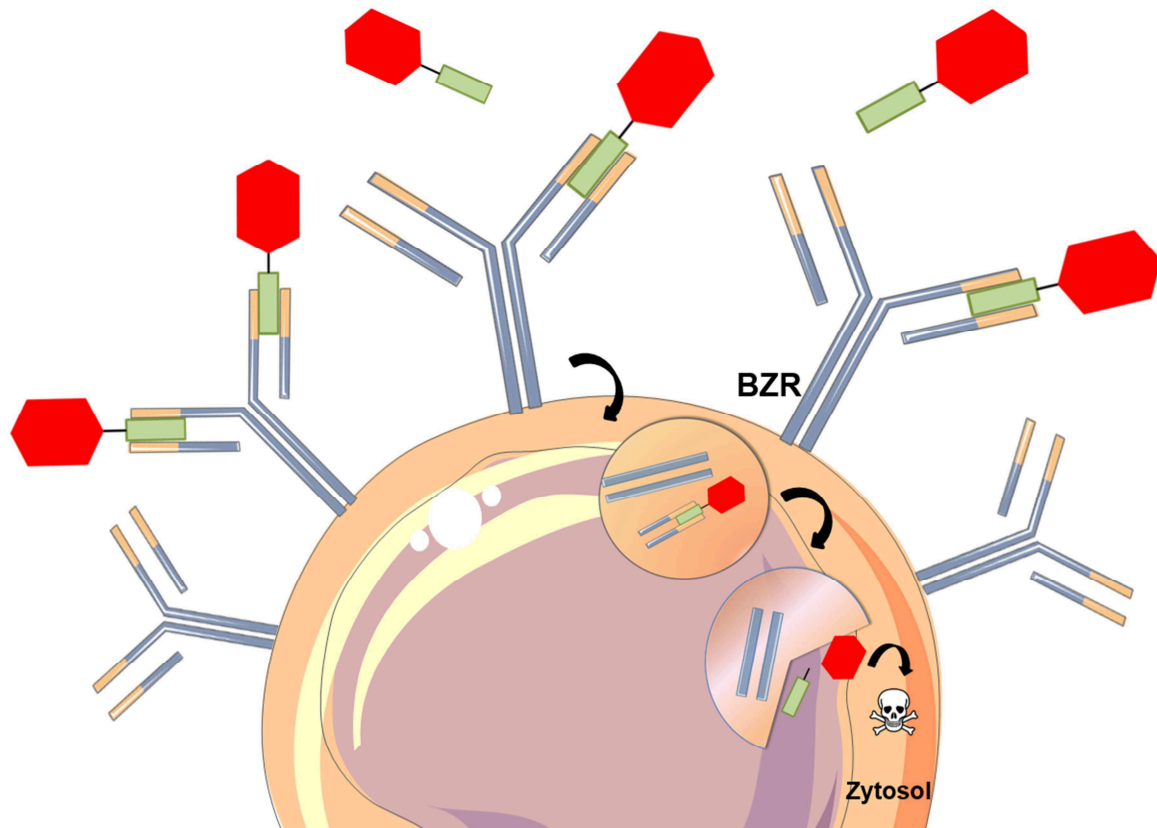


Abbildung 3: Antigen-spezifische Elimination autoreaktiver B-Zellen mit zytotoxisch wirksamen Fusionsproteinen.

1) Bindung des Antigen-basierten Fusionsproteins an den B-Zellrezeptor, 2) Rezeptor-vermittelte Internalisierung des Antigen-B-Zellrezeptor-Komplexes, 3) Freisetzung der zytotoxischen/zytolytischen Effektor-domäne ins Zytosol und 4) Hemmung der Proteinsynthese bzw. Auslösung der Apoptose. Abbildung wurde modifiziert nach [77].

Die ersten klinischen Studien mit auf ETA-basierenden Immuntoxinen sind bereits erfolgreich abgeschlossen worden. Moxetumomab, ein anti-CD22-(Fv) RFB4 Antikörper fusioniert mit einer modifizierten ETA Variante (PE38) zeigte erste Erfolge und befindet sich nun in einer Phase III Studie [78]. Das LMB-2, ein anti-Tac-Antikörper konjugiert mit einer modifizierten Variante des *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A wurde in einer klinischen Studie der Phase II zusammen mit einem Immunsuppressivum und Chemotherapeutikum (Cyclophosphamid, Fludarabine) verabreicht. Durch diese Kombination konnte eine vollständige Remission bei Patienten mit T-Zell Leukämie erreicht werden [79]. Jedoch weisen Immuntoxine basierend auf bakteriellen oder pflanzlichen Toxinen oder murinen mAk Fragmenten selbst eine Immunogenität auf, sodass Patienten nach den ersten ein bis zwei Medikamentengaben neutralisierende Antikörper bilden können. Weiterhin können die Immuntoxine in hohen Konzentrationen auch eine unspezifische Toxizität aufweisen [66, 71, 78]. Zur Verringerung der Immunogenität der Immuntoxine werden humane monoklonare Antikörper

Fragmente, chemische Modifikationen über Polyethylenylation, mutagenisiertes ETA mit dem Ziel der Verringerung einer Immunantwort angewendet [80-82]. Die nächste Entwicklungsstufe der Immuntoxine zur Verminderung der Immunogenität ist die Verwendung von humanen enzymatisch aktiven Proteinen als Effektor-domänen, sodass humane Fusionsproteine entstehen. Dafür können pro-apoptotische Proteine (z.B. Granzym B), Ribonukleasen (z.B. Angiogenin), Kinasen (z.B. DAP-Kinase) oder das Mikrotubuli-assoziierte Protein Tau (MAPTau) eingesetzt werden [66, 83-85].

Zur Familie der Serinproteasen gehören die Granzyme, wobei fünf verschiedene Granzym-Arten (A, B, H, K und M) bei Menschen, hauptsächlich von zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen, exprimiert werden. Dabei ist Granzym B (GrB) einer der erfolgversprechendsten Kandidaten beim Einsatz als Effektor-domäne in zytolytischen Fusionsproteinen [83, 85-87]. Granzym B wird als inaktives Pro-Enzym produziert und durch N-terminale Spaltung des Dipeptids Glycin-Glutaminsäure durch die Cystein-Serin-Protease Cathepsin C aktiviert. Dadurch entsteht eine allosterische Änderung des aktiven Zentrums von Granzym B. Aktiviertes GrB und andere Granzym-Arten, sowie Perforin werden in lytischen Granula gespeichert [83, 88]. Gelangt das aktivierte Granzym B ins Zytosol der Zielzelle, kann es sowohl über den Caspase-abhängigen als auch über den Bid-Protein-Signalweg die Apoptose induzieren [89-91]. Bei der Caspase-abhängigen Induzierung werden Pro-Caspasen, wie z.B. Caspase-3 aktiviert und somit die Caspase-Signalkaskade induziert [88]. Im Bid-Protein-Signalweg kann Granzym B die Haupt-Caspase-Substrate, wie z.B. BH3-only Protein, Bid und ICAD (Inhibitor der Caspase-aktivierten DNase) spalten, sodass es zur Aktivierung der pro-apoptotischen Bcl-2 Familie mit den Proteinen Bak/Bax kommt [88, 92]. In verschiedenen präklinischen Studien für die Krebstherapie konnte die Effizienz des GrBs, in nativer oder mutierter Form, als Effektor-domäne innerhalb humaner Fusionsproteine erfolgreich demonstriert werden [85, 87, 93-95]. Bei der mutierten Granzym B Variante (R201K) wurde in Position 201 das Arginin gegen Lysin ausgetauscht, welches den Vorteil bringt, dass diese Variante resistent gegenüber den natürlichen Serpin B9 (PI9) Inhibitor ist [85, 96]. Bei der Herstellung von Fusionsproteinen mit GrB als Effektor-domäne werden diese als das inaktive Dipeptid (EGrB) im eukaryotischen Expressionssystem produziert. Anschließend wird durch einen Enterokinaseverdau ein freier NH₂-Terminus des GrB Proteins, welcher für die enzymatische Aktivität notwendig ist, erzeugt [95, 97].

Im Gegensatz zu den Enzymen wird die Aktivität des Mikrotubuli-assoziierten Proteins Tau (MAP Tau) nicht durch native Inhibitoren gehemmt. Das MAP Tau Protein existiert in sechs Isoformen, resultierend aus alternativen Prozessierungsprozessen der Vorläufer-RNA. Die Isoform 3 ist dabei die kleinste Isoform und enthält alle notwendigen Mikrotubuli-Bindungssequenzen. MAP Tau ist an der Regulation des Auf- und Abbaus der Mikrotubuli während der Mitose beteiligt [98-102]. Dabei erfolgt die Dynamik des Auf- und Abbaus unter raumzeitlicher Kontrolle, die durch mehrere Phosphorylierungen reguliert ist. Nicht-phosphorylierte Varianten des Proteins können während der Mitose zur Verringerung der Dynamik bis zu einem kritischen Niveau beitragen, sodass letztendlich

die Apoptose induziert wird [102, 103]. Die in der Arbeitsgruppe Immuntherapie (Fraunhofer Institut für Molekularbiologie und angewandte Ökologie IME Aachen) modifizierte MAP Tau Variante enthält Mutationen an kritischen Serin-Phosphorylierungssequenzen, sodass an den Aminosäuresequenzen 156 und 204 die vorhandenen Serine durch Alanin ersetzt wurden [84]. Dieses mutierte MAP Tau Proteins wurde erfolgreich in verschiedenen präklinischen Studien in der Krebstherapie als Effektordomäne eingesetzt [84, 104, 105].

I.5 Fusionsproteine für die Diagnostik

Für diagnostische Anwendungen kann anstatt einer toxischen Effektordomäne ein sogenannter SNAP-tag in Fusionsproteinen verwendet werden. Der SNAP-tag ist ein Derivat des humanen DNA-Reparaturenzyms O(6)-Alkylguanin DNA Alkyltransferase und vermittelt eine kovalente, irreversible Bindung von Benzylguanin (BG)-modifizierten Substanzen an das Fusionsprotein. Dadurch ist eine 1:1 stöchiometrische Kopplung von BG-modifizierten Farbstoffen an den SNAP-tag des Zielproteins möglich [106-108]. Eine Vielzahl von BG-modifizierten Farbstoffen sind für die *in vitro* und *in vivo* Diagnostik verfügbar.

I.6 Machbarkeitsstudie mit Modellantigen

Die Identifikation neuartiger Autoantigene, welche exklusiv für eine bestimmte Autoimmunerkrankung sind, gehört seit Jahren zu einem der arbeitsintensivsten Forschungsfelder. Ziel dabei ist es, mithilfe der neu entdeckten Autoantigene Pathomechanismen aufzuklären und die Entwicklung neuer Therapieformen so voranzutreiben. Beispielsweise konnte ein pathogenes Autoantigen bei Multipler Sklerose, das Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG) als Zellbindedomäne innerhalb eines neu generierten Autoimmuntoxins eingesetzt werden [109]. Für die Etablierung der neuen Therapiestrategien über Antigen-spezifische Fusionsproteine im humanen System tritt beispielsweise bei SLE-Patienten die Schwierigkeit auf, dass die Frequenz an dsDNA-spezifischen B-Zellen nur gering ist [52, 110] und damit die Analyse einer B-Zell eliminierenden Wirkung in diesem Rahmen erschwert wird. Aufgrund dessen wurde in dieser Arbeit auf ein etabliertes Modellantigen - das Tetanustoxin (TT) - zurückgegriffen. Die Verwendung eines solchen Modellantigens bietet einige Vorteile: a) die hohe weltweite Tetanus-Impfquote verbunden mit der Option des Zugriffs auf Lymphozyten immunisierter Blutspender [111], b) eine bekannte und ausreichend hohe Frequenz an TTC-spezifischen B-Zellen im peripheren Blut immunisierter Individuen [54] und c) die Verfügbarkeit einer TTC-reaktiven Hybridomzelllinie (5E4) [111] als zelluläres Testsystem für die *in vitro*-Charakterisierung neuer Antigen-spezifischer Fusionsproteine. Das Tetanustoxin wird von *Chlostridium tetani* produziert und ist eines der wirksamsten bakteriellen Toxine. Das 150 kDa große Polypeptid besteht aus einer schweren und leichten Kette und bindet an die Ganglioside G_{T1B} der terminalen Membran präsynaptischer Nerven innerhalb der Muskeln, wo es inhibitorisch die Neurotransmitter-Impulse im zentralen Nervensystem blockiert [111-113]. Die C-

laminin globular domains (LG3-5) of the laminin α 1-chain were produced using prokaryotic or eukaryotic expression systems, respectively. By *in vitro* analysis of the novel human laminin-fusion proteins autoantibodies against the laminin α 1-chain fragments could be detected in serum and urine samples of patients with SLE. Using the murine derived laminin-based fusion proteins anti-laminin autoantibodies could be detected in serum and urine samples of K14-CD40ligand (L) transgenic (tg) mice, which develop SLE-like symptoms. These results indicates that the laminin α 1-chain could be used for further *in vivo* studies or generation of cytotoxic fusion proteins.

In summary a new approach of the direct elimination of autoreactive B-lymphocytes using antigen-based fusion proteins was developed. Such novel antigen-based fusion proteins could be used for future development of tailor-made therapeutics in autoimmune diseases.

Expressionsvektoren (pPB-LC-EGFP / pPB-HC-tm-EGFP) beinhalten zusätzlich eine interne Ribosomenerkennungssequenz zur Ableitung des grün-fluoreszierenden Markerproteins (eGFP), sodass eine erste positive Selektion transfizierter Zielzellen über das Fluoreszenzsignal des grün-fluoreszierende Proteins erfolgen kann (Abbildung 4).

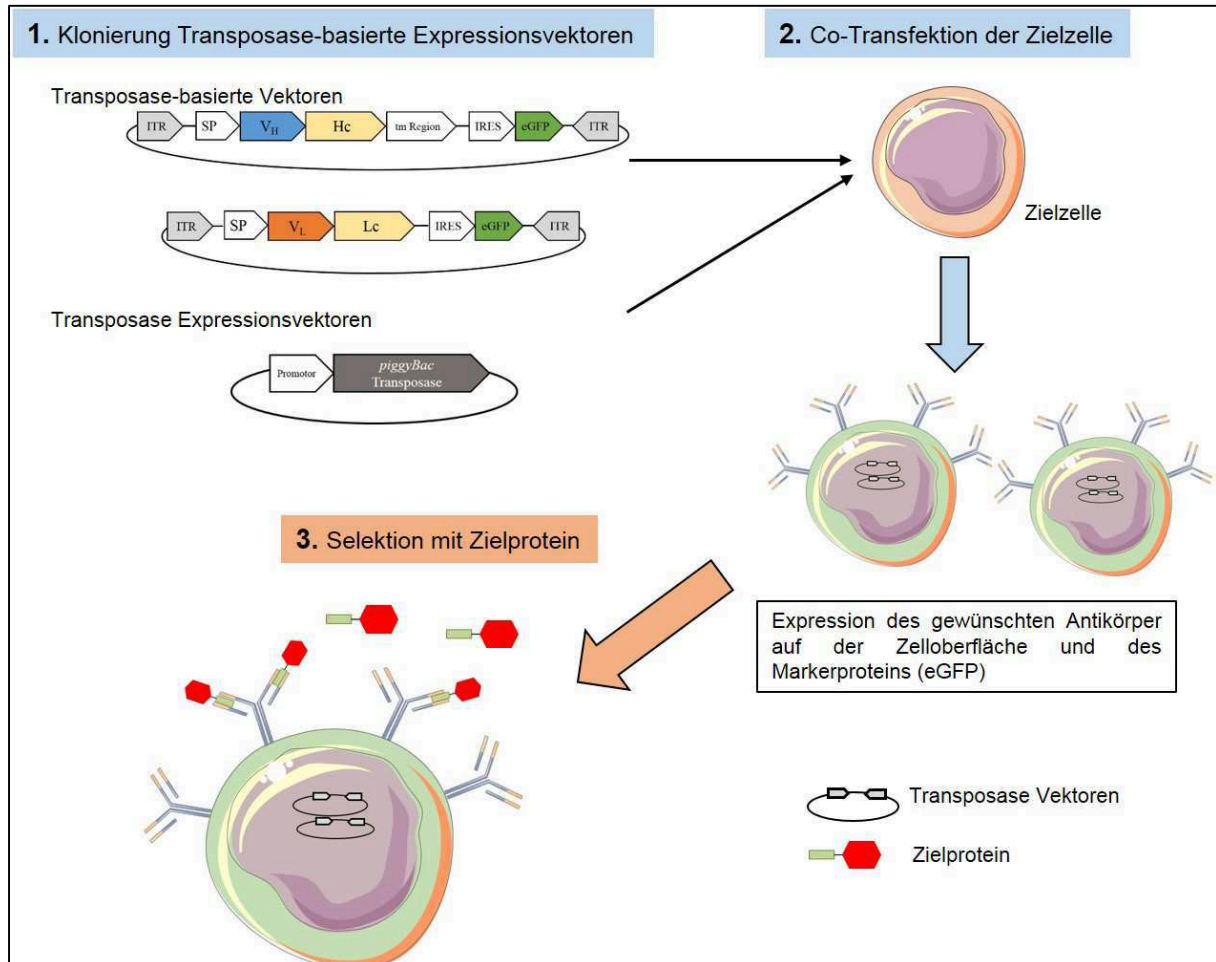


Abbildung 4: Transposase-basierter Gentransfer mittels Transpo-mAb® Technologie.

Die Transpo-mAb® Technologie [125] verwendet einen Expressionsvektor für die Expression der *piggyBac* Transposase in der Zielzelle, sowie zwei Transposase-basierte DNA-Abschnitte (1) mit „inverted terminal repeats“ (ITRs), die die gewünschte Ziel-DNA (Antikörper Fragmente) flankieren. Durch Co-Transfektion der Zielzelle (2) wird durch die transient exprimierte Transposase die Ziel-DNA ins Genom integriert und es erfolgt die Expression des gewünschten Antikörpers sowie dem zusätzlichen Markerprotein. Im dritten Schritt erfolgt eine Selektion mit dem Zielprotein der Zellen, die das gewünschte Protein in dem vorliegenden Fall auf der Zelloberfläche exprimieren (3).

Abkürzungen: ITR - „inverted terminal repeats“, SP – Signalpeptidsequenz, V_H – variable Region der schwere Kette, Hc – schwere Kette des Antikörpers, tm Region – transmembran Region des Antikörpers, IRES - „internal ribosomal entry site“, eGFP- „enhanced“ grün-fluoreszierendes Protein, VL – variable Region der leichten Kette, Lc – leichte Kette des Antikörpers; Die Abbildung wurde modifiziert nach [126].

Eine weitere Selektion erfolgt über das Zielprotein (Antigen), welches an den exprimierten Antikörpern auf der Zelloberfläche bindet (Abbildung 4). Diese Technik wird für die Herstellung von Tetanustoxin Fragment C spezifischen Zellen, welche einen humanen lymphozytischen Charakter aufweisen, verwendet. Dabei werden die DNA-Informationen der murinen TTC-reaktiven Antikörper der Hybridomzelllinie 5E4 [111] identifiziert und in die Transposase-basierten Expressionsvektoren

kloniert. Für die Selektion positiver, transfizierter Zellen werden in der vorliegenden Arbeit die TTC-basierten Fusionsproteine verwendet.

II Ziel der Arbeit

Ein vielversprechender therapeutischer Ansatz von Autoimmunerkrankungen ist die Verwendung von Antigen-spezifischen zytotoxischen Fusionsproteinen gegen autoreaktive B-Lymphozyten. Da die Frequenz solcher autoreaktiver B-Zellen im peripheren Blut sehr gering ist, sollte im Rahmen dieser Arbeit auf ein Modellantigen (Tetanustoxin Fragment C, TTC) als Zellbindedomäne zurückgegriffen werden. Dabei soll die spezifische Zellbindung und Eliminierung über den BZR von humanen autoreaktiven B-Zellen insbesondere den humanen CD27⁺ Gedächtnis-B-Zellen durch ein neu generiertes Autoimmuntoxin gezeigt werden. Für diese Machbarkeitsstudie sollten verschiedene TTC-basierte Fusionsproteine (SNAP-TTC, TTC-ETA) generiert werden. Die notwendigen Voraussetzungen eines effektiven Immuntoxins, wie spezifische Zellbindung, schnelle Internalisierung und Induzierung von Apoptose sollte zunächst an murinen Hybridomzellen überprüft werden. Anschließend sollte die *ex vivo*-Charakterisierung der TTC-basierten Fusionsproteine an isolierten humanen TTC-reaktiven Gedächtnis-B-Lymphozyten von Tetanus-immunisierten Spendern erfolgen. Die Möglichkeit der Verwendung von humanen Effektordomänen innerhalb der toxischen TTC-basierten Fusionsproteine sollte als nächster Schritt untersucht werden. Dafür sollten Fusionsproteine mit der Granzym B-Mutante R201K als auch mit dem Mikrotubuli-assoziierten Protein Tau hergestellt werden. Mittels Transpo-mAb® Technologie sollte ein humanes zelluläres TTC-reaktives Testsystem für die *in vitro*-Charakterisierung der TTC-basierten Fusionsproteine mit humanen Effektordomänen erstellt werden. Final sollte die Übertragung der Plattform-Technologie zur Herstellung von Antigen-basierten Fusionsproteinen mit verschiedenen Effektordomänen auf ein pathogenetisch relevantes Autoantigen bei SLE- Patienten übertragen werden. Hierfür wurden Fragmente der α 1-Kette des Laminins identifiziert. Diese sollten innerhalb der zytotoxischen Fusionsproteine als Zellbindedomäne eingesetzt werden. Die neu generierten Laminin-basierten Fusionsproteine sollten mittels prokaryotischer bzw. eukaryotischer Expression hergestellt, gereinigt und für erste *in vitro*-Charakterisierung an Seren und Urinproben von SLE-Patienten bzw. K14-CD40L-tg Mäusen verwendet werden.

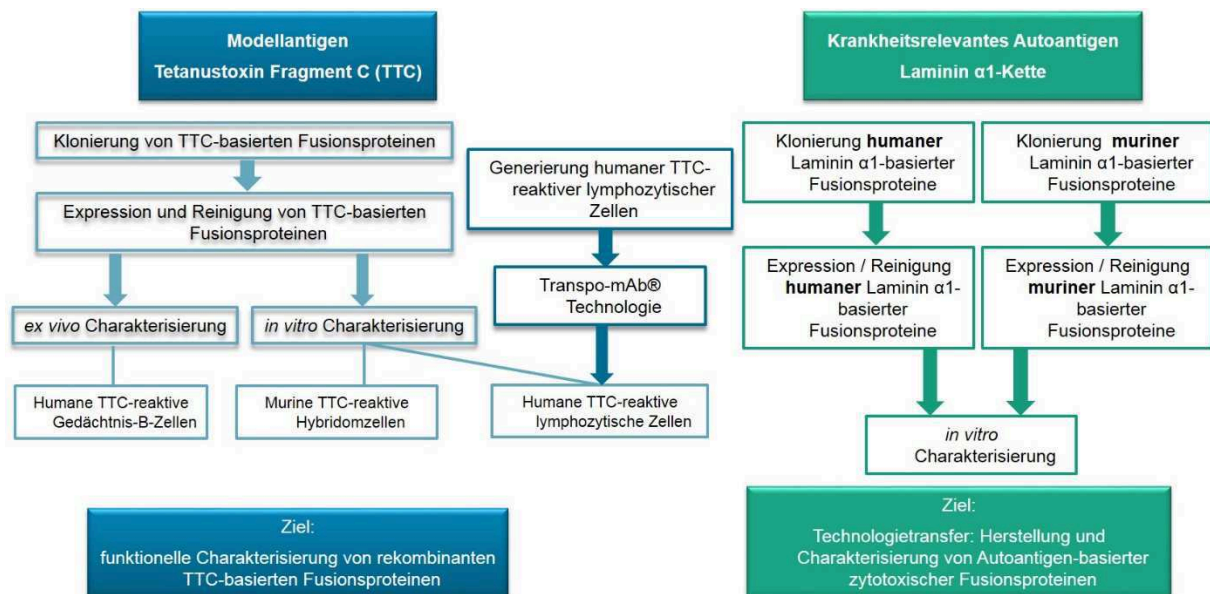


Abbildung 5 Darstellung des Arbeitsablaufes als Flussdiagramm

Abkürzungen: TTC – Tetanustoxin Fragment C

Wissenschaftliche Veröffentlichungen innerhalb des Promotionsprojekts

Klose D, Saunders U, Barth S, Fischer R, Jacobi AM, Nachreiner T. Novel fusion proteins for the antigen-specific staining and elimination of B cell receptor-positive cell populations demonstrated by a tetanus toxoid fragment C (TTC) model antigen. *BMC Biotechnology*, 2016; 16:18

Klose D, Woitok M, Niesen J, Beerli R, Grawunder U, Barth S, Fischer R, Fendel R and Nachreiner T. Generation of an artificial human B cell line test system using the Transpo-mAb® technology to evaluate the therapeutic efficacy of novel antigen-specific fusion proteins, submitted to PLOS ONE

Wissenschaftliche Veröffentlichungen außerhalb des Promotionsprojekts

Woitok M, **Klose D**, Niesen J, Richter W, Abbas M, Stein C, Fendel R, Bialon M, Püttmann C, Fischer R, Barth S, Kolberg K. The efficient elimination of solid tumor cells by EGFR-specific and HER2-specific scFv-SNAP fusion proteins conjugated to benzylguanine-modified auristatin F. *Cancer Lett*, 2016, 381, (2), p. 323–330

Mladenov R, Hristodorov D, Cremer C, Gresch G, Grieger E, Schenke L, **Klose D**, Amoury M, Woitok M, Jost E, Brümmendorf T, Fendel R, Fischer R, Stein C, Thepen T, Barth S. CD64-directed microtubule associated protein tau kills leukemic blasts ex vivo, *Oncotarget*, 2016, doi: 10.18632/oncotarget.11568

Woitok M, **Klose D**, DiFiore S, Richter W, Gresch G, Grieger E, Stein C, Barth S, Fischer R, Kolberg K, Niesen J, Comparison of mouse and human scFv-SNAP-auristatin F drug conjugates with potent activity against EGFR overexpressing solid tumor cells. submitted to *Journal of Immunotherapy*

Reaktionskits

CloneJET PCR Cloning Kit	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
NucleoSpin® Extract II Kit (Plasmid DNA Reinigung)	Macherey & Nagel, Düren
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Macherey & Nagel, Düren
NucleoBond® Xtra Midi/ Maxi Kit	Macherey & Nagel, Düren
NucleoSpin RNA II (RNA Isolierung)	Macherey & Nagel, Düren
Taq PCR Master Mix Kit	Qiagen, Hilden
Rapid DNA Dephos & Ligation Kit	Roche, Mannheim

III.1.3 Geräte- und Apparaturenliste

Autoklaven:	Varioklav (H+P) 135S (H+P Labortechnik GmbH Oberschleißheim) Systec HX-430 (Systec, Wettenberg)
Bildgebungsgerät:	MAESTRO™ In-vivo Imaging System CRi (Cambridge & Instrumentation, Inc., Woburn, MA, USA)
Durchflusszytometer:	BD Influx™ (BD Biosciences) & BD FACST™ Software v1.X; FACSVerse™ (BD Biosciences) & BD FACSuite™ Software
Eismaschine:	Icematic D201 (Castel Mac, Castelfranco Veneto, Italien)
Elektrophorese:	Mini-Protean® 3 Cell, Mini Trans Blot® Cell, Netzteil: Power Pac Basis/HC (alle Bio-Rad Laboratories GmbH)
Elisa Plattenleser:	Epoch (BioTek, Bad Friedrichshall)
FPLC:	ÄKTApurifier (GE Healthcare, Freiburg)
FPLC Säule	Ni-NTA Superflow Cartridges (Qiagen, Hilden)
Heizblock:	QBT (Grant, Cambridge, UK)
Inkubatoren:	Function Line Typ UT12 (Heraeus, Hanau), CB210 (Binder, Tuttlingen)
Mikroskope:	Leica TCS SP8 Konfokallasermikroskop (Leica, Wetzlar), Software: LAS AF, Leica DMR-HC (Leica), Software: Leica QWin
Mikrowelle:	OMV330D-M (OK, Imtron GmbH, Ingolstadt)
MilliQ Anlage	Aquinta Ls Membra-Pure mit MemCap1, 0,2µm PES Reinstwasseranlage (Membra-Pure, Bodenheim)
Pipetten/Pipettierhilfen:	Transferpette -8/-12 electronic (Brand, Wertheim), CellMate II Pipettus (Thermo Fisher Scientific), Pipetman Starter Kit (Gilson, Middleton, USA)
pH-Meter:	Basic Meter PB-11 (Sartorius, Göttingen)
Photometer:	Biophotometer (Eppendorf)
Scanner:	HP Scanjet 4890 (Hewlett Packard, Böblingen)

Schüttel- und Mixgeräte:	Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, New York, USA), Magnetrührer RCT basic (IKA, Staufen), Thermomixer „comfort“ und „compact“ (Eppendorf), Innova™ 4430 Incubator Shaker (New Brunswick Scientific)
Sterilbänke:	Biowizard 2 MSC (Kojair, Berkshire, UK) mit Gasprofi 2 (WLDTEC, Göttingen), Herasafe Typ HS-9 (Heraeus, Hanau)
Thermokonstanträume:	Krum-Schröder/Pfeiffer
Ultraschallgerät:	Sonopuls, HD2070, Typ UW207 (Bandelin Electronic GmbH & Co. KG, Berlin)
Ultraschallsonde:	KE76 (Bandelin Electronic GmbH & Co. KG, Berlin)
UV-Transilluminator:	Fotodokumentation Gel Doc XR System (Bio-Rad); Image Lab 5.0 Software
Waagen:	Präzisions- und Analysewaagen ‚Talent‘: TE6101, TE64, TE31025, TE12000 (Sartorius, Göttingen)
Wasserbad:	TW20 (Julabo, Seelbach)
Zellzähler:	Casy® Cell Counter (Schärfe System, Reutlingen)
Zentrifugen:	Eppendorf-Tischzentrifuge 5415D und 5415R (Eppendorf), Multifuge S und 3S-R (Heraeus), Avanti J-25I Zentrifuge (Beckman Coulter, Krefeld), Rotina 420 R (Hettich Lab Technology), Biofuge Pico (Heraeus, Hanau).

III.1.4 Puffer und Lösungen

In der vorliegenden Arbeit wurden die verwendeten Puffer und Lösungen standardmäßig nach Sambrook *et al.* [127] mit deionisiertem Wasser (MilliQ) hergestellt. Die Zusammensetzung ist in Tabelle 3 aufgeführt. Zur Sterilisation wurden Lösungen bei 121°C (1 bar, 20 Minuten) autoklaviert bzw. mithilfe eines Spritzenvorsatzfilters (0,2 µm) steril filtriert.

Tabelle 3 Zusammensetzung aller häufig verwendeten Puffer und Lösungen.

Puffername	Zusammensetzung	Konzentration
Annexin-Puffer (10x), pH 7,4	HEPES	0,1 M
	NaCl	1,4 M
	CaCl	25 mM
AP-Puffer, pH 9,6	Tris-HCl	100 mM
	NaCl	100 mM
	MgCl ₂ x 6H ₂ O	5 mM
Blockierungspuffer 1	Milchpulver (in 1x PBS)	5% (w/v)
Blockierungspuffer 2	BSA (in 1x PBS)	4% (w/v)
Coomassie-Brilliant-Blau-Färbelösung	Coomassie Brilliant Blue G250	0,25% (w/v)
	Methanol	50% (v/v)
	Essigsäure	9% (v/v)

GrB-Substratpuffer, pH 7,4	NaCl	100 mM
	HEPES	50 mM
	DTT	10 mM
	EDTA	1 mM
	Glyzerin	10% (v/v)
	CHAPS	0,1% (v/v)
Equilibrierungspuffer, pH 8,0	Na ₂ PO ₄	50 mM
	NaCl	300 mM
Elutionspuffer, pH 8,0	Na ₂ PO ₄	50 mM
	NaCl	300 mM
	Imidazol	250 mM
FACS Färbepuffer	1x PBS	
	EDTA	5 mM
	FCS	2% (v/v)
Inkubationspuffer (5x), pH 8,0	Na ₂ PO ₄	300 mM
	NaCl	1,5 M
	Imidazol	50 mM
Ladepuffer (5x), pH 6,8	Tris-HCl	62,5 mM
	Glyzerin	30% (v/v)
	SDS	4% (w/v)
	β-Mercaptoethanol	10% (v/v)
	Bromphenolblau	0,05% (w/v)
Lysispuffer, pH 8,0	Tris-HCl	75 mM
	NaCl	300 mM
	DTT	5 mM
	EDTA	10 mM
	Glyzerol	10% (v/v)
	NBT/BCIP	Nitro-Blau-Tetrazolium-Chlorid (NBT)
5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP)		1,65% (w/v)
PBS (10x), pH 7,4	NaCl	1,37 M
	KCl	27 mM
	Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	81 mM
	KH ₂ PO ₄	15 mM
PBS-T, pH 7,4	Tween® 20 (in 1x PBS)	0,05% (v/v)
Sammelgel, pH 6,8	Acrylamid/Bisacrylamid (30/1)	5% (v/v)
	Tris-HCl (pH 6,8)	150 mM
	SDS (10% (w/v))	0,1% (v/v)
	TEMED	0,1% (v/v)
	APS	0,1% (v/v)
TGS (1x), pH 8,3	Tris-HCl	25 mM
	Glyzin	192 mM
	Natriumdodecylsulfat (SDS)	0,1% (w/v)
Transferpuffer, pH 8,3	Tris-HCl	25 mM

	Glyzin	192 mM
	Methanol	20% (v/v)
Trenngel, pH 8,8	Acrylamid/Bisacrylamid (30/1)	12% (v/v)
	Tris-HCl (pH 8,8)	375 mM
	SDS (10% w/v)	0,1% (v/v)
	TEMED	0,1% (v/v)
	APS	0,1% (v/v)
Tris-Puffer, pH 7,4	Tris-HCl	20 mM
	NaCl	200 mM

III.1.5 Nährlösungen, Medien und Zusätze für die Kultivierung von Bakterien und eukaryotischer Zellen

Nährlösungen und Zusätze für die Kultivierung von Bakterien:

Nährlösungen wurden bei 121°C für 20 Minuten autoklaviert und anschließend die entsprechenden Antibiotika hinzugefügt.

LB-Medium, pH 7,4

1% (w/v) Bakto-Trypton; 1% (w/v) NaCl; 0,5% (w/v) Hefeextrakt, (zzgl. Antibiotika-Zusätze)

SOC Medium, pH 7,4

2% (w/v) Bakto-Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 25 mM Glukose; 10 mM NaCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄, (zzgl. Antibiotika-Zusätze)

TB-Medium, pH 7,4

1,2 % (w/v) Bakto-Trypton; 2,4 % (w/v) Hefeextrakt; 0,5 % (v/v) Glycerol; 0,72 M K₂HPO₄; 0,17 M KH₂PO₄, (zzgl. Antibiotika-Zusätze)

Antibiotika-Zusätze:

Ampicillin (100 µg/µl Endkonzentration)

Kanamycin (50 µg/µl Endkonzentration)

Medien und Zusätze für die Kultivierung eukaryotischer Zellen:

R10-Medium

RPMI-1640 + GlutaMAX™ (Thermo Fisher Scientific) wurde mit 10% (v/v) fötalem Kälberserum (FCS) (Gibco), 50 µg/µl Penicillin und 100 µg/µl Streptomycin versetzt. Die Kultivierung von transfizierten Zellen erfolgte mit zusätzlich 100 µg/µl Zeocin.

R20-Medium

RPMI-1640 + GlutaMAX™ (Thermo Fisher Scientific) wurde mit 20% (v/v) FCS (Gibco), 50 µg/µl Penicillin und 100 µg/µl Streptomycin versetzt

Inhaltsverzeichnis

I	Einleitung.....	1
I.1	Systemischer Lupus Erythematoses (SLE).....	1
I.2	Eigenschaften autoreaktiver B-Lymphozyten.....	4
I.3	Therapieansätze zur SLE Behandlung.....	6
I.4	Antigen-spezifische Eliminierung autoreaktiver B-Zellen.....	9
I.5	Fusionsproteine für die Diagnostik.....	12
I.6	Machbarkeitsstudie mit Modellantigen.....	12
I.7	Herstellung einer TTC-reaktiven humanen lymphozytischer Zelllinie mithilfe der Transpo-mAb®-Technologie.....	13
II	Ziel der Arbeit.....	16
III	Material und Methoden.....	18
III.1	Material.....	18
III.1.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	18
III.1.2	Standards und Reaktionskits.....	18
III.1.3	Geräte- und Apparaturenliste.....	19
III.1.4	Puffer und Lösungen.....	20
III.1.5	Nährlösungen, Medien und Zusätze für die Kultivierung von Bakterien und eukaryotischer Zellen.....	22
III.1.6	Antikörper und Antikörperkonjugate.....	24
III.1.7	Bakterienstämme.....	24
III.1.8	Synthetische Oligonukleotide und Vektoren.....	25
III.1.9	Zelllinien.....	27
III.1.10	Benzylguanin (BG) -modifizierte Fluoreszenzfarbstoffe.....	28
III.2	Methoden.....	28
III.2.1	Molekularbiologisches Arbeiten.....	28
III.2.1.1	Präparation von Plasmid-DNA.....	28
III.2.1.2	Isolierung von mRNA und cDNA-Synthese.....	28
III.2.1.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Kolonie-PCR.....	29

III.1.6 Antikörper und Antikörperkonjugate

Die in Tabelle 4 aufgeführten Antikörper wurden zur Detektion der rekombinanten Proteine in Western Blot-Analysen (III.2.8.4), Durchflusszytometrie (III.2.12) und ELISA Assays (III.2.19) verwendet.

Tabelle 4 Übersicht der verwendeten Antikörper.

Abkürzungen: Ak = Antikörper, AP = Alkalische Phosphatase, APC = Allophycocyanin, Cy7 = Cyanin7, DZ = Durchflusszytometrie, FITC = Fluorescein, PE = Phycoerythrin, PO = Peroxidase, WB = Western Blot.

Bezeichnung	Abkürzung	Firmenname	Anwendung
Anti-Penta-His-AlexaFluor-488	α -His-488	Qiagen	DZ
Anti-Penta-His PE	α -His PE	Miltenyi Biotec	DZ
Annexin-V-APC	AnnexinV	eBioscience	DZ
Maus anti-His ₆ , IgG2B	α -His	Thermo Fisher Scientific	DZ, WB
Maus anti-Human Igkappa leichte Kette spezifisch PE-Cy7	α -Igkappa-PE-Cy7	eBioscience	DZ
Ziege anti-Maus IgG, FC spezifisch AP	$G\alpha M^{AP}$	Sigma-Aldrich	WB
Ziege anti-Maus IgM, FC spezifisch AP	$G\alpha M2^{AP}$	Sigma-Aldrich	WB
Ziege anti-Maus IgG, F(ab') ₂ PE	$G\alpha M^{PE}$	Dianova	WB
Ziege anti Maus IgG, FC spezifisch PO	$G\alpha M^{PO}$	Sigma-Aldrich	ELISA
„QuantiBrite ^{PE} Beads“		BD Biosciences	DZ

III.1.7 Bakterienstämme

In der Tabelle 5 sind die verwendeten Bakterienstämme für die Klonierungsarbeiten (III.2.1.9) und die Expressionen rekombinanter Proteine (III.2.8.1) in *E. coli* aufgelistet.

Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Bakterienstämme

Bakterienstämme	Genotyp	Firmenname	Anwendung
DH5 α TM	F- Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rK-, mK+) <i>phoA supE44</i> λ - <i>thi-1 gyrA96</i> <i>relA1</i>	Thermo Fisher Scientific	Klonierung
BL21(DE3)	F- <i>ompT gal dcm lon hsdSB</i> (rB- mB-) λ (DE3 <i>lacI lacUV5-T7p07</i> <i>ind1 sam7 nin5</i>) (<i>malB+</i>)K-12(λ S)	Merck Millipore	Proteinexpression
Rosetta TM 2(DE3)	F- <i>ompT hsdSB</i> (rB- mB-) <i>gal dcm</i> pRARE2 (CamR)	Merck Millipore	Proteinexpression

III.1.8 Synthetische Oligonukleotide und Vektoren

Für die Klonierungsarbeiten (III.2.1.9) wurden nachfolgende Oligonukleotide (Primer) von Eurofins Genomics synthetisiert und für die DNA-Amplifikation über Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR), sowie für die Sequenzierung verwendet (Tabelle 6).

Tabelle 6: Übersicht der synthetischen Oligonukleotide

Name	Sequenz (5'-3')	Verwendung
5'-pMT-for	CATCATCACAGCAGCGGCCATAT	Sequenzierung
5'-ETA rev	CCAGCGGCAGGTGGCAGG	Sequenzierung
Igkappa5-for	AGACAGACACACTCCTGCTATGG	Sequenzierung
Hinterhis rev (pMS)	CCAACAGCTGGCCCTCGCAGACAG	Sequenzierung
Seq TTC for	CCAGCTATCTGAGCATTAC	Sequenzierung
Seq TTC rev	CACATTGCGGCCGCATCTGGTC	Sequenzierung
T7 Prom for	TAATACGACTCACTATAG	Sequenzierung
T7 Term rev	TACAGGGCGCGTCCCATTCG	Sequenzierung
SfiI-NcoI-VRTh-V1	CTTACTAGGCCAGCCGGCCATGGCCAAAGAGGGCTACAA AG	PCR Amplifikation
VRTh-V1-rev	CGATCTAGCGGCCGCAGCGTTCCCGTCAACAATC	PCR Amplifikation
VRTh-V2-rev	CGATCTAGCGGCCGC ATAAATGGGATTGTTGGTGTC	PCR Amplifikation
Sfi-VRTh-V3-for	CTTACTAGGCCAGCCGGCC GATGTGGAGGGTTTG	PCR Amplifikation
VRTh-V3-rev3:	CGATCTAGCGGCCGC CTGCGAGGAGGTTTCGAAAC	PCR Amplifikation
hum-Lam-G5-for	CTTACTAGGCCAGCCGGCCATGGCCGATGTGGAGGGTTT GTTC	PCR Amplifikation
hum-Lam-G5-rev	CGATCTAGCGGCCGCACAGGAATGAAGGAAAATC	PCR Amplifikation
Lam1-h-V4for	CTTACTAGGCCAGCCGGCCGTAGAAAGCAGGACGATAAA TGTG	PCR Amplifikation
VRTm-V3-rev3	CGATCTAGCGGCCGCCTTAGAGGTAGTACGGAATCC	PCR Amplifikation

Lam1-m-V4-for	CTTACTAGGCCCCAGCCGGCCACCCCGATGCTCAAGATGC	PCR Amplifikation
Lama1-mV6-for	CTTACTAGGCCCCAGCCGGCCAAGATGCGGACTTCGTTCC	PCR Amplifikation
Lama-mV6-rev	CGATCTAGCGGCCGCTTGGAGCTGGAGCGTGG	PCR Amplifikation
Mus-Lam-G5-for	CTTACTAGGCCCCAGCCGGCCATGGCCTTTGAAGGAAGCGG ATATGC	PCR Amplifikation
Mus-Lam-G5-rev	CTAGATGCGGCCGCGGGCAGAGTTTCGGGCTCAGGCC	PCR Amplifikation
His-mV6-BamHI- for	CTTACTAGGATCCGCATCACCATCACCATCACACCCCGATG CTCAAGATG	PCR Amplifikation
Lama1-mV6-rev	CGATCTAGCGGCCGCTTGGAGCTGGAGCGTGG	PCR Amplifikation
NotI-ETA-PPD-for	CTTACTAGCGGCCGCGCTTCCGGAGG	PCR Amplifikation
SacI-ETA-PPD-rev	CGATCTAGGAGCTCTTACTTCAGGTCCTC	PCR Amplifikation
AgeI-VL-TTC-fwd	CTTACTAACCGGTGTACATTCTGACATCCAGATGACTCAG	PCR Amplifikation
BsiWI-VL-TTC-rev	TAGTAAGCGTACGTTTGATTTCCAGCTTGGTGCC	PCR Amplifikation
AgeI-VH-TTC- fwd:	CTTACTAAACCGGTGTGCACTCCGAGGTGCAGCTGAAGGA GTC	PCR Amplifikation
VH-TTC-Sal-rev	TAGTAAGGTCGACGCTGAGGAGACGGTGACTGAGG	PCR Amplifikation
BstBI-LCpTT5-rev	TAGTAAGTTCGAACTCTAGACTAACACTCTCCCCTGTTGAA G	PCR Amplifikation
VH-TTC-NheI-rev	TAGTAAGGCTAGCTGAGGAGACGGTGACTGAG	PCR- Amplifikation
NotI-leader-fwd	CTTACTAGCGGCCCGCCATGGGATGGTCATGTATCATCC	PCR- Amplifikation

In der Tabelle 7 sind die verwendeten Vektoren für die Klonierung (III.2.1.5, III.2.1.6) der Expressionsvektoren sowie die cDNA Klone für die PCR Amplifikation (III.2.1.3) der humanen/ Maus Laminin $\alpha 1$ DNA-Sequenzen aufgelistet.

Für die prokaryotische Proteinexpression wurde der pBM- [72] bzw. pET51b-Vektor und für die eukaryotische Expression der pMS-Vektor [128] verwendet.

Tabelle 7: Übersicht der verwendeten Vektoren, der synthetischen DNA und der cDNA-Klone

Vektoren/synthetische DNA/cDNA Klone	Beschreibung	Bezugsquelle/Referenz
pBM-Vektor	Ursprung pET27b, für prokaryotische Proteinexpression	[72]
pET51b-Vektor	für prokaryotische Proteinexpression mit Strep-tag und His-tag	Novagen
pMS-Vektor	Ursprung pSECTag2B-Vektor, für eukaryotische Proteinexpression	[128]
pPB-AC10-LC/HC-EGFP	eukaryotische Expressionsvektoren mit humanen konstanten Antikörper-Regionen eines anti-CD30 Antikörpers, sowie einer Transmembran-Region	NBE Therapeutics, Basel [125]
pcDNA3.1-hy-mPB	eukaryotischer Expressionsvektor, der die Information für die <i>piggyBac</i> Transposase enthält	NBE Therapeutics, Basel
TTC cDNA	GenBank FJ917402.1, synthetisierte DNA, <i>E.coli</i> -codonoptimiert, 5'- <i>Sfi</i> I Schnittstelle, 3'- <i>Not</i> I Schnittstelle	Life Technologies™ GeneArt®
pTT5	Eukaryotischer Expressionsvektor zur Expression von Antikörpern	[129]
cDNA Klone mit humaner Laminin α 1-Kette	I.M.A.G.E. <i>Fully Sequenced cDNA Clone</i> (partial cds) IRALp962E2250Q	Source BioScience
cDNA Klone mit Maus-Laminin α 1-Kette	ORF Expression Clone, ORFeome (shuttled): OCACo5052F0114D	Source BioScience

III.1.9 Zelllinien

Die in Tabelle 8 aufgeführten Zelllinien wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet. Die Tabelle enthält eine kurze Beschreibung sowie die Expression relevanter Oberflächenrezeptoren als auch die Herkunft der Zelllinien.

Tabelle 8: Übersicht der verwendeten eukaryotischen Zelllinien.

Abkürzungen: BZR = B-Zellrezeptor, DNA = Desoxyribonukleinsäure– Desoxyribonukleinsäure, MOG = Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein, TTC = Tetanustoxin Fragment C

Zelllinie	Beschreibung	Referenz
5E4	Tetanustoxin Fragment C-reaktive Hybridomzelllinie	[111]
8.18-C5	Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG)-reaktive Hybridomzelllinie	[130]
HEK 293T	humane embryonale Nierenzelllinie, Expression des SV40 large T-Antigen	ATCC CRL-11268
REH	humane lymphozytische pro-B Zelllinie gewonnen aus akuter lymphozytische Leukämie (non-T; non-B)	NBE Therapeutics, Dr. Roger Beerli
C72	DNA-/ Laminin-reaktive Hybridomzelllinie (IgG2a)	[131]
AK8	Laminin-reaktive Hybridomzelllinie (IgM)	[132]

III.1.10 Benzylguanin (BG) -modifizierte Fluoreszenzfarbstoffe

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende BG-modifizierte Fluoreszenzfarbstoffe zur Kopplung an SNAP-Fusionsproteine (III.2.9) verwendet.

Tabelle 9: Übersicht der verwendeten BG-modifizierten Fluoreszenzfarbstoffe.

Farbstoff	Abkürzung	Firma
SNAP-Surface® Alexa Fluor® 488	BG-488	New England Biolabs
SNAP-Surface® Alexa Fluor® 647	BG-647	New England Biolabs

III.2 Methoden

III.2.1 Molekularbiologisches Arbeiten

Alle aufgeführten Methoden wurden entsprechend der standardisierten Techniken und Arbeitsvorlagen nach Sambrook und Russel [127] durchgeführt. Die gentechnischen Arbeiten wurden am Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und Angewandte Oekologie IME, Aachen in der Sicherheitsstufe S1 (64-K.1.51/05, Anlagenummer 993) und der Sicherheitsstufe S2 (64-K-1.50/05, Anlagenummer 992) durchgeführt.

III.2.1.1 Präparation von Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte mithilfe des NucleoSpin® Extract Kit II bzw. des NucleoBond® Xtra Midi/Maxi Kit (III.1.2) unter Berücksichtigung der Herstellerangaben. Hierfür wurden 5 ml bzw. 200 ml LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotikazusätzen (III.1.4) mit einer Bakterienkolonie beimpft und über Nacht (16 Stunden) bei 37 °C im Rotations- bzw. Schüttelinkubator inkubiert. Die isolierte Plasmid-DNA wurde durch Kontrollverdau mit Restriktionsendonukleasen überprüft und die geschnittenen DNA-Fragmente über Agarosegel-Elektrophorese (III.2.1.4) separiert. Die Konzentrationsbestimmung der Plasmid-DNA erfolgte photometrisch (III.2.1.7).

III.2.1.2 Isolierung von mRNA und cDNA-Synthese

Die Isolierung der mRNA aus der TTC-reaktiven Hybridomzelllinie 5E4 (III.1.9) erfolgte mithilfe des NucleoSpin RNA II Kits unter Berücksichtigung der Herstellerangaben (III.1.2). Es wurden hierfür 10^6 Zellen geerntet und die mRNA isoliert, gereinigt und bei -80 °C gelagert. Zur Kontrolle der erfolgreichen Isolierung wurde eine Agarosegel-Elektrophorese (III.2.1.4) mit einem 1,2 %igem (w/v) Agarosegel durchgeführt. Die Konzentration der mRNA wurde photometrisch bestimmt (III.2.1.7). Die isolierte mRNA dient als Ausgangsmaterial für die nachfolgende cDNA-Synthese, welche mit dem First Strand cDNA Synthesis Kit (III.1.2) und mitgelieferten oligo (dt) Primern laut

Herstellerangaben durchgeführt wurde. Die cDNA Konzentration wurde photometrisch (III.2.1.7) bestimmt.

III.2.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Kolonie-PCR

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) handelt es sich um eine enzymatische Reaktion, die zur Amplifikation und Modifikation von DNA sowie zum Einfügen von Restriktionsschnittstellen verwendet wird. Die Amplifikation von DNA mittels PCR erfordert zwei Primer (III.1.8), die homolog zu den flankierenden Sequenzen des herzustellenden DNA-Fragments sind. Für die Amplifikation der Laminin-Konstrukte wurden die unter III.1.8 aufgeführten cDNA-Klone als Template (III.1.8) verwendet und dafür der in Tabelle 10 beschriebene Reaktionsansatz berücksichtigt. Die Identifikation und Amplifikation der variablen Antikörperfragmente des TTC-reaktiven Antikörpers aus der murinen Hybridomzelllinie 5E4 erfolgte via „V-gene rescue“ mit der zuvor generierten cDNA (III.2.1.2) und den von Bialon *et al.* [133] zur Verfügung gestellten Oligonukleotiden.

Tabelle 10: PCR-Reaktionsansatz

Reaktionskomponente	Endkonzentration
5x Phusion HF Buffer	1x
10 mM dNTPs	200 μ M
5'-Primer (10 μ M)	0.5 μ M
3'-Primer (10 μ M)	0.5 μ M
cDNA	250 ng
Phusion DNA Polymerase	1 unit/ 50 μ l PCR Ansatz

Die PCR Reaktionen erfolgten in 0,2 ml PCR-Gefäßen in einem PCR-Thermocycler mit den in Tabelle 11 aufgeführten Reaktionsschritten. Die DNA wurde anschließend mittels analytischer Agarosegel-Elektrophorese auf einem 1,2%igem (w/v) Agarosegel überprüft.

Tabelle 11: PCR-Reaktionszyklen

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
initiale Denaturierung	98 °C	30 Sekunden	1x
Denaturierung	98 °C	10 Sekunden	25-35 x
Annealing	45-72 °C	30 Sekunden	
Elongation	72 °C	15-30 Sekunden/kb	
finale Elongation	72 °C	10 Minuten	1x

Für die Kolonie-PCR wurde der *Taq* PCR MasterMix (III.1.2) verwendet und anhand der Herstellerangaben mit einer gepickten Bakterienkolonie durchgeführt. Die amplifizierte DNA wurde mit der Agarosegel-Elektrophorese auf einem 0,8%igen (w/v) Agarosegel überprüft.

III.2.1.4	Agarosegel-Elektrophorese	30
III.2.1.5	Restriktionsverdau von DNA-Fragmenten	30
III.2.1.6	Ligation von DNA-Fragmenten.....	30
III.2.1.7	Bestimmung der DNA-Konzentration.....	31
III.2.1.8	Herstellung von Hitzeschock-kompetenten Bakterien	31
III.2.1.9	Transformation von Plasmid-DNA in Hitzeschock-kompetente Bakterien	31
III.2.1.10	Sequenzierung von DNA.....	31
III.2.2	Kultivierung von eukaryotischen Zellen.....	31
III.2.3	Stimulierung muriner Hybridomzellen	32
III.2.4	Transfektion von HEK293T-Zellen	32
III.2.5	Transfektion von REH-Zellen.....	32
III.2.6	Zellsortierung	32
III.2.7	Isolierung von humanen B-Zellen.....	33
III.2.8	Reinigung und Analyse von rekombinanten Proteinen.....	34
III.2.8.1	Periplasmatische Proteinexpression in <i>E. coli</i>	34
III.2.8.2	Proteinreinigung mittels Immobilisierter-Metallionen- Austauschchromatographie (IMAC).....	34
III.2.8.3	SDS-PAA-Gelelektrophorese.....	35
III.2.8.4	Western Blot-Analyse	35
III.2.8.5	Bestimmung der Proteinkonzentration	35
III.2.9	Kopplung der SNAP Fusionsproteine mit BG-markierten Molekülen	36
III.2.10	Enterokinase Verdau	36
III.2.11	Granzym B-Substratassay	36
III.2.12	Bindungsaktivität der rekombinanten Fusionsproteine.....	36
III.2.13	Bindungsnachweis von Fusionsproteinen an humane B-Zellen.....	37
III.2.14	Bestimmung der Rezeptordichte auf der Zelloberfläche.....	37
III.2.15	Zellviabilitätsassay/Zellproliferationsassay	37
III.2.16	Apoptose-Assay mittels AnnexinV-Bindung.....	38
III.2.17	Enzyme-Linked Immuno Spot Assay (ELISpot)	38
III.2.18	Konfokalmikroskopie.....	38

Nach der „V-gene rescue“ PCR wurden die amplifizierten Antikörper-Fragmente (V_L/V_H -TTC, III.2.1.3) mithilfe des CloneJET PCR Cloning Kits (III.1.2) laut Herstellerangaben in den pJET-Vektor kloniert und über Hitzeschock in kompetente *E.coli* Bakterien (III.2.1.8) transformiert.

III.2.1.7 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration der verschiedenen DNA-Fragmente (III.2.1.2, III.2.1.3, III.2.1.5) sowie der mRNA (III.2.1.2) wurden photometrisch bei einer OD_{260nm} im Epoch ELISA Plattenleser (BioTek, Bad Friedrichshall) bestimmt. Die Reinheit der DNA wurde durch die Messung des Verhältnisses $OD_{260/280nm}$ bestimmt. Reine DNA zeichnet sich durch Werte zwischen 1,8 und 2,0 aus.

III.2.1.8 Herstellung von Hitzeschock-kompetenten Bakterien

Für die Amplifikation von Plasmid-DNA wurden Hitzeschock-kompetente *E. coli* DH5 α (III.1.7) nach der Methode von Douglas Hanahan [134] hergestellt und anschließend bei -80 °C gelagert. Die Expressionsstämme *E. coli* BL21(DE3) bzw. Rosetta™ 2(DE3) (III.1.7) wurden von Novagen (jetzt: Merck Millipore, Darmstadt) bezogen und in Aliquots von 10 μ l bei -80 °C gelagert.

III.2.1.9 Transformation von Plasmid-DNA in Hitzeschock-kompetente Bakterien

Für die Transformation der Ligationsansätze (III.2.1.6) in Hitzeschock-kompetente *E. coli* Zellen (III.2.1.8), wurde ein Aliquot der Zellen auf Eis aufgetaut und für 30 min mit Plasmid-DNA inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock bei 42 °C für 15s im Thermoblock. Nach 2-minütiger Inkubation der Zellen auf Eis wurde 900 μ l vorgewärmtes SOC-Medium (III.1.5) hinzugegeben und der Ansatz bei 37 °C für eine Stunde auf dem Rotationsinkubator inkubiert. Die Transformation von den Hitzeschock-kompetenten *E.coli* BL21(DE3)/Rosetta™ 2(DE3) Zellen wurde nach Herstellerangaben durchgeführt und der Transformationsansatz bei 37 °C für eine Stunde inkubiert. Die transformierten *E. coli* Zellen wurden jeweils auf Antibiotika-haltigen LB-Agar Platten ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

III.2.1.10 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung der DNA-Konstrukte wurde von der Sequencing Facility des Fraunhofer IME in Aachen durchgeführt. Dafür wurden 400-600 ng Plasmid DNA (III.2.1.1) oder 140-160 ng/kb PCR Produkt (III.2.1.3) mit 20 pmol des entsprechenden Sequenzierungsprimers (III.1.8) in einem Gesamtvolumen von 30 μ l angesetzt. Die Analyse und die Dokumentation der Sequenzierdaten erfolgte mithilfe der Software CLC Workbench Version 7.5 (QIAGEN Aarhus A/S).

III.2.2 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Murine Hybridomzellen (III.1.9), transfizierte HEK 293T Zellen (III.2.4) und REH-Zellen (III.1.9) wurden in R10 Medium (III.1.5) bei 37 °C in einer feuchten Atmosphäre von 5% CO₂ kultiviert. Zum Passagieren wurden die konfluent gewachsenen Zellen zweimal pro Woche mithilfe eines Zellschabers vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst, durch vorsichtiges Pipettieren vereinzelt und anschließend

in einem Verhältnis von 1:10 mit frischem R10 Medium versorgt. Die Zellzahl wurde mit dem Casy Cell Counter (Schaerfe System, Reutlingen) nach Herstellerangaben bestimmt.

III.2.3 Stimulierung muriner Hybridomzellen

Um die Menge an B-Zellrezeptoren auf der TTC-reaktiven Hybridomzelllinie 5E4 zu steigern, wurden die Zellen mit R10 Medium (III.1.5) versetzt, welches zusätzlich mit verschiedenen Konzentrationen von 5 µg/ml oder 10 µg/ml LPS (Sigma Alderich, Taufkirchen) und 5 µg/ml bzw. 10 µg/ml rekombinantem TTC Protein (III.2.8.2) komplexiert wurde. Die Inkubation erfolgte für 24 bzw. 48 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂.

III.2.4 Transfektion von HEK293T-Zellen

Für die Transfektion wurden HEK 293T Zellen in einer 6-well Platte mit 1×10^5 Zellen pro Vertiefung ausgesät und für 24 h bei 37 °C, 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit RPMI Medium ohne Zusätze zweimal gewaschen und mit einem Transfektionsgemisch aus 2 µg Plasmid DNA (III.2.1.1) und gleichem Volumen Roti Fect[®] Transfektionsreagenz (Roth, Karlsruhe) in RPMI Medium (Gibco) ohne Zusätze (Endvolumen: 500µl) beschichtet. Die transfizierten Zellen wurden expandiert und der Zellkulturüberstand für eine nachfolgende Proteinreinigung (III.2.8.2) gesammelt.

III.2.5 Transfektion von REH-Zellen

Für die Herstellung einer humanen TTC-transgenen Zelllinie wurden REH-Zellen mit den Vektoren pPB-V_L-TTC-EGFP, pPB-V_H-TTC-EGFP (III.2.1.3, III.2.1.6) und pcDNA3.1-hyPB (III.1.8) mittels Elektroporation Co-transfiziert. Hierfür wurden jeweils 30 µg pPB-V_L-TTC-EGFP, pPB-V_H-TTC-EGFP und 10 µg pcDNA3.1-hy-mPB in 400 µl RPMI Medium (Gibco) ohne Medienzusätze angesetzt und 5×10^6 REH-Zellen/ml zweimal mit RPMI gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet mit 3 ml RPMI Medium resuspendiert, 400 µl dieser Zellsuspension durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren mit dem DNA-Reaktionsansatz vermischt und in eine Elektroporations-Küvette (4 mm Durchmesser, BioRad, München) transferiert. Die Elektroporation erfolgte bei 250 V und 950 µF im GenePulser (BioRad). Anschließend wurden die Zellen in der Küvette für 10 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert, damit die Zellmembran sich wieder schließen kann. Die Zellen wurden in frischem, vorgewärmtem (37 °C) R10 Medium (III.1.5) aufgenommen und bei 300 xg, 3 min zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Ausplattierung der transfizierten REH-Zellen in 2 ml R10 Medium (III.1.5) in einer Vertiefung einer 6-Well-Platte. Die erfolgreiche Transfektion wurde mittels Durchflusszytometrie (III.2.13) anhand der Expression des Reporterproteins GFP überprüft und die transfizierten REH-Zellen (III.2.5) in T25 Zellkulturflaschen expandiert. Als Kontrollzelllinie wurden die REH-Zellen mit den Ausgangsvektoren (pPB-LC/HC-eGFP, III.1.8) wie oben beschrieben Co-transfiziert und ebenfalls selektioniert. Diese Kontrollzelllinie wird als Mock-transfizierte REH-Zellen bezeichnet.

III.2.6 Zellsortierung

Die Zellsortierung TTC-positiver REH-Zellen (III.2.5) wurde mithilfe des BD Influx™ (BD Bioscience, Heidelberg) Durchflusszytometers vorgenommen. Dafür wurden zunächst die benötigten FACS-Röhrchen (12x75 mm, BD Falcons™) mit Blockierungspuffer 2 (III.1.4) über Nacht bei 4 °C blockiert. Für die Zellsortierung wurden 10^6 - 10^7 der transfizierten REH-Zellen (III.2.5) zweimal mit FACS-Färbepuffer (III.1.4) gewaschen und anschließend mit 1 µg SNAP-TTC-BG-647 Protein (III.2.9) auf Eis für 20 min inkubiert. Nach einem Waschschrift mit R10 Medium (III.1.5) wurden die Zellen in einer Konzentration von 1×10^6 - 1×10^7 /ml in das zuvor blockierte FACS-Röhrchen gegeben. Die Zellsortierung TTC-positiver REH-Zellen erfolgte anhand der Fluoreszenzintensitäten des gebundenen SNAP-TTC-BG-647 Proteins (III.2.9) und des GFP-Reporterproteins. Für die Zellsortierung der Mock-transfizierten REH-Zellen (III.2.5) wurden der α -Igkappa-PE-Cy7 Antikörper (III.1.6) und das GFP-Fluoreszenzsignal verwendet. Die doppelt positiven Zellen wurden in FACS-Röhrchen aufgefangen und nach Aufnahme in frischem R20 Medium (III.1.5) in einer 24-well Platte bei 5% CO₂ und 37 °C kultiviert und expandiert (III.2.2).

III.2.7 Isolierung von humanen B-Zellen

Für die Zellbindungs- (III.2.13) und Toxizitätsanalysen (III.2.17) der rekombinanten TTC-basierten Proteine auf humanen Gedächtnis-B-Zellen, wurden CD27⁺ Gedächtnis-B-Zellen aus Leukozytenfiltern von Tetanus-immunisierten Spendern isoliert. Hierbei wurden zunächst unter Verwendung des RosetteSep™ Human B Cell Enrichment Cocktail Kit (STEMCELL Technologies SARL, Grenoble, France) laut Herstellerangaben und einer Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, München) Dichtegradientenzentrifugation alle B Zellen isoliert. Nach zwei Waschschriften mit PBS/0,5 % (w/v) BSA (Sigma-Aldrich) wurden die B-Zellen mit CD27 MicroBeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) über eine LS Säule unter Verwendung des MidiMACS™ Separators (Miltenyi Biotec) nach Herstellerangaben isoliert. Anschließend wurden die isolierten CD27⁺ Gedächtnis-B-Zellen mit einer Konzentration von 1×10^5 /ml Zellen in R10 Medium (III.1.5) in 96-well Rundboden-Platten (Greiner Bio-One, Frickenhausen) mit 2,5 µg/ml CpG Oligodeoxnukleotide 2006 (5'-TCgTCgTTTTgTCgTTTTgTC-3', TIB MolBiol, Berlin) und 50 ng/ml Interleukin-21 (Life Technologies, Darmstadt) in humider Atmosphäre bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Am zweiten Kultivierungstag wurden 10 nM rekombinantes TTC-Protein beziehungsweise TTC-ETA' Fusionsprotein zu den Zellen gegeben und am vierten Kultivierungstag wurden die Zellen für nachfolgende ELISpot-Analysen (III.2.17) geerntet.

Für die durchflusszytometrische Analysen wurden PBMCs mittels Ficoll-Gradienten aus dem Leukozytenfilter gereinigt und die CD19-positiven B-Zellen mit magnetischer Zellisolation unter Verwendung von CD19 MicroBeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) über eine LS Säule unter Verwendung des MidiMACS™ Separators (Miltenyi Biotec) nach Herstellerangaben isoliert. Anschließend wurden die isolierten CD19⁺ B-Zellen mit 2,5 µg/ml CpG Oligodeoxnukleotide 2006 (5'-TCgTCgTTTTgTCgTTTTgTC-3', TIB MolBiol, Berlin) und 50 ng/ml Interleukin-21 (Life

Technologies, Darmstadt) in humider Atmosphäre bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Diese CD19⁺ Plasmablasten/-zellen wurden am vierten Tag der Kultivierung mithilfe der Durchflusszytometrie (III.2.13) auf TTC-spezifische CD19⁺Plasmazellen untersucht.

Diese Experimente wurden von unseren Projektpartnern Dr. Ute Saunders und Prof. Annett Jacobi am Uniklinikum Münster in der Sektion Rheumatologie und Klinische Immunologie in enger Abstimmung mit der Ethikkommission Westfalen-Lippe und der medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms Universität Münster (Ethiknummer: 2009-413-f-S) durchgeführt. Die Spender haben schriftlich ihr Einverständnis gegeben und ihren Tetanus-Impfstatus freiwillig genannt.

III.2.8 Reinigung und Analyse von rekombinanten Proteinen

III.2.8.1 Periplasmatische Proteinexpression in *E. coli*

Die periplasmatische Expression der Proteine TTC, TTC-ETA' sowie der Laminin-basierten Proteine wurde in *E.coli* BL21 (DE3) oder *E.coli* Rosetta™ 2 (DE3) (III.1.7) unter osmotischen Stressbedingungen wie von Barth *et al.* [135] beschrieben durchgeführt. Dafür wurden die Bakterien bis zu einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von 1,6 bei 180 rpm und 26 °C kultiviert und anschließend mit 0,5 M Sorbitol, 10 mM Betain, 4 % (w/v) NaCl und 100 ml TB-Medium (III.1.5) komplexiert. Nach weiteren 30 Minuten Inkubation wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 2 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Nach 16 h Inkubation der Bakterienkulturen wurden die Zellen per Zentrifugation (8000 x g, 15 min, 4 °C) geerntet. Das Zellpellet wurde bis zum Zellaufschluss bei -80°C gelagert. Zum Zellaufschluss wurde das Zellpellet in Lysepuffer (III.1.4), welcher mit Protease-Inhibitoren (1 Tablette/50 ml Puffer, Roche, Mannheim) versetzt wurde, gelöst und der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall (9 Zyklen, 1 min, 70 % Power, 3 Wiederholungen). Nach Zentrifugation (30.000 x g, 30 min, 4 °C) wurde der Überstand über Nacht bei 4 °C gegen 1x Inkubationspuffer (III.1.4) mittels Dialyseschlauch (Zellutrans, MWCO 6.000 – 8.000, Carl Roth) dialysiert.

III.2.8.2 Proteinreinigung mittels Immobilisierter-Metallionen-Austauschchromatographie (IMAC)

Die Reinigung der rekombinanten Proteine aus bakteriellem Zelllysate beziehungsweise dem Zellkulturüberstand transfizierter HEK 293T-Zellen erfolgte mithilfe der Immobilisierten-Metallionen-Austauschchromatographie (IMAC). Dafür wurde die Ni-NTA Superflow Säule (Qiagen, Hilden) an das ÄKTApurifier System (GE Healthcare) angeschlossen und mit Equilibrierungspuffer (III.1.4) gewaschen. Bevor das Bakterienlysate oder der Zellkulturüberstand auf die Säule aufgetragen wurde, erfolgte eine Entfernung von Zelltrümmern durch Zentrifugation (400 x g, 10-20 min, 4 °C) und anschließender Filtration (Cellulose-Acetat Filter 2-4,5 µm Porengröße) mit einer Druckkammer (vacuum filtration station 16249, Satorius). Der Zellkulturüberstand wurde dann mit 5-fach Inkubationspuffer (III.1.4) versetzt. Die Säule wurden jeweils durch 2 Waschschrte mit Inkubationspuffer (III.1.4) inklusive 10 mM bzw. 40 mM Imidazol zur Entfernung von unspezifisch

III.2.19	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	39
III.2.20	Statistische Analysen und Auswertungen	40
III.2.21	Bildbearbeitung.....	40
IV	Ergebnisse	41
IV.1	Charakterisierung Antigen-basierter Fusionsproteine.....	41
IV.1.1	Herstellung und <i>in vitro</i> -Charakterisierung TTC-basierter Fusionsproteine	41
IV.1.2	<i>Ex vivo</i> -Charakterisierung TTC-basierter Proteine auf humanen Gedächtnis-B-Zellen	48
IV.2	Charakterisierung humaner Effektordomänen	50
IV.2.1	Herstellung und <i>in vitro</i> -Charakterisierung von GrB-TTC und TTC-MAPTau	51
IV.2.2	Generierung von TTC-reaktiven humanen lymphozytischen Zellen.....	53
IV.2.2.1	Klonierung der Transposase-basierten Expressionsvektoren	53
IV.2.2.2	Transfektion humaner lymphozytischer REH-Zellen und Anreicherung positiv transfizierter Zellen.....	54
IV.2.3	<i>In vitro</i> -Charakterisierung der TTC-basierten Fusionsproteine auf humanen TTC-reaktiven REH-Zellen.....	56
IV.2.3.1	Bindungsnachweis der rekombinanten TTC-basierten Fusionsproteine auf TTC-reaktiven REH-Zellen	57
IV.2.3.2	Internalisierungsverhalten des SNAP-TTC Proteins auf humanen TTC-reaktiven REH-Zellen.....	57
IV.2.3.3	Zytotoxizität der TTC-Fusionsprotein mit humanen Effektordomänen auf TTC-reaktive REH-Zellen	58
IV.3	Herstellung Autoantigen-basierter zytotoxischer Fusionsproteine	61
IV.3.1	Identifikation eines SLE-spezifischen Autoantigens	61
IV.3.2	Herstellung und <i>in vitro</i> -Charakterisierung von humanen Laminin α 1-basierten Fusionsproteinen	63
IV.3.3	Herstellung und <i>in vitro</i> -Charakterisierung muriner Laminin α 1-basierten Fusionsproteine	66
V	Diskussion.....	73
V.1	Charakterisierung TTC-basierter Fusionsproteine.....	74

III.2.9 Kopplung der SNAP Fusionsproteine mit BG-markierten Molekülen

Das SNAP-TTC Fusionsprotein wurde mit einem BG-modifizierten Fluoreszenzfarbstoff (III.1.10) in 1,5-fachem molarem Überschuss zusammen mit 1 mM DTT zur Verbesserung der Kopplungseffizienz für 1 h bei RT gekoppelt. Nachfolgend wurde der überschüssige Farbstoff durch die Verwendung von Micro Bio-Spin 6 Säule (BioRad, München) nach Herstellerangaben entfernt. Die erfolgreiche Kopplung wurde nach einer SDS-PAGE der Proteine und vor der Färbung mit Coomassie Brilliant Blue (III.2.8.3) im Maestro™ In-Vivo Fluorescence Imaging System (Cambridge Research & Instrumentation, Inc., Woburn, MA, USA) mittels des blauen Filtersets (500 -700 nm) und des gelben Filtersets (630-850 nm) aufgenommen. Die Lagerung der SNAP-TTC-Fluoreszenzfarbstoff markierten Konstrukte erfolgte bei -20 °C oder kurzzeitig bei 4 °C.

III.2.10 Enterokinase Verdau

Zur Aktivierung der Granzym B-Effektordomäne des rekombinanten Fusionsproteins EGrB(R201K)-TTC wurde mit einer rekombinanten Enterokinase (Merck Millipore, Darmstadt), welche die spezifische N-terminale Aminosäuresequenz AspAspAspAspLys erkennt, durchgeführt. Hierfür wurden von der Enterokinase 1 Unit/1 µg Protein und 2 mM CaCl₂ in Tris-HCl Puffer (III.1.4) eingesetzt und bei 23 °C für 16 h inkubiert. Das verdaute/aktivierte GrB(R201K)-TTC Protein wurde mit PD MiniTrap G-25 Säulen (GE Healthcare, Freiburg) gegen 1x PBS (III.1.4) umgepuffert und bei -20 °C gelagert.

III.2.11 Granzym B-Substratassay

Nach dem Enterokinaseverdau (III.2.10) wurde die funktionelle Domäne auf ihre Aktivität des GrB(R201K)-TTC Proteins hin getestet. Dafür wurde ein kolorimetrischer Substratassay mit dem synthetischen Substrat Ac-IETD-*p*NA (Calbiochem/Merck, Darmstadt) durchgeführt. Je 500 ng des unverdaute EGrB(R201K)-TTC Proteins und das verdaute GrB(R201K)-TTC Protein wurden in GrB-Substratpuffer (III.1.4) mit dem synthetischen Substrat in einer 96-well Platte über 60 min inkubiert, wobei im 2-min-Intervall die Kinetik im ELISA-Plattenleser (III.1.3) aufgenommen wurde. Die Messungen erfolgten in Duplikaten.

III.2.12 Bindungsaktivität der rekombinanten Fusionsproteine

Eine spezifische Zellbindung der rekombinanten TTC- bzw. Laminin-basierten Fusionsproteine wurde mithilfe von durchflusszytometrischen Untersuchungen analysiert. Hierfür wurden jeweils $1-5 \times 10^5$ Zellen pro Ansatz verwendet. Alle Waschschrte erfolgten bei 500 x g, 3 min und 4 °C mit 1x PBS bzw. FACS-Färbepuffer (III.1.4). Die Zellen wurden mit je 100 nM rekombinantem Protein für 20 min auf Eis inkubiert, gewaschen und anschließend mit einem entsprechenden Detektionsantikörper (α -His-Alexa-488, GaM^{PE} bzw. α -His-PE AK, III.1.6, 1:200 in PBS/FACS-Färbepuffer) für 20 min inkubiert. Nach Entfernung überschüssiger Detektionsantikörper durch einen Waschschrte wurden alle Ansätze im FACSVerse™ Durchflusszytometer (BD Bioscience) mit der FACSuite Software

gemessen und ausgewertet. Das Kontrollprotein EGrB(R201K)-Mock wurde freundlicherweise von Dr. Grit Hehmann-Titt (Pharmedartis GmbH, Aachen) zur Verfügung gestellt, das Mock-MAPTau Protein stellte Severin Schmies (Fraunhofer IME, PPD, Aachen) bereit.

III.2.13 Bindungsnachweis von Fusionsproteinen an humane B-Zellen

Der Bindungsnachweis der TTC-basierten Fusionsproteine (III.2.8.2) an humane CD19⁺ B-Zellen erfolgte bei unseren Projektpartnern am Uniklinikum Münster (Sektion Rheumatologie und Klinische Immunologie). Dafür wurde der monoklonale anti-CD19 (#560911) Antikörper (BD Biosciences) und das rekombinante SNAP-TTC-BG-647 Protein (III.2.8.1, III.2.8.2, III.2.9) verwendet. Für den Zellbindungsnachweis wurden die polyklonal aktivierten CD19⁺ B-Zellen (III.2.7) nach viertägiger Kultivierung gewaschen und mit dem SNAP-TTC-BG-647 Protein inkubiert. Für die intrazelluläre Färbung wurden die B-Zellen gleichzeitig mit Saponin behandelt. Bei der Oberflächenfärbung wurden die toten Zellen durch die Färbung mit 220 nM 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Life Technologies) ausgeschlossen. Die Durchflusszytometrie-Analysen wurden mit dem FACSCanto™ mit der FACS DIVA Software (BD Bioscience) durchgeführt und die Ergebnisse wurden mit der FlowJo Software (Treestar, Ashland, OR, USA) ausgewertet.

III.2.14 Bestimmung der Rezeptordichte auf der Zelloberfläche

Die Bestimmung der Rezeptordichte auf der Zelloberfläche TTC-reaktiver Hybridomzellen und TTC-reaktiver REH-Zellen (III.1.9) wurde mit „Quantibrite^{PE} Beads“ (III.1.6) nach Herstellerangaben durchgeführt. Dafür wurde die Fluoreszenzintensität nach Bindung des G α M^{PE} Antikörpers (III.1.6) bei den Hybridomzellen (III.1.9) bzw. nach Bindung des α -His-PE Antikörpers (III.1.6) an das gebundene TTC-Protein bei TTC-reaktiven REH-Zellen (III.2.5), wie in III.2.12 beschrieben, dokumentiert.

III.2.15 Zellviabilitätsassay/Zellproliferationsassay

Mithilfe des XTT-basierten Zellviabilitätsassays wurde die Toxizität der Fusionsproteine auf den Zielzellen bestimmt. Dabei wurden 1×10^5 Zellen/ml in 96-well Platten ausgesät und mit einer seriellen Verdünnung der Fusionsproteine (50-500 nM) für 72 h bei 37 °C, 5% CO₂ im Zellkulturinkubator inkubiert. Als Kontrollen dienten unbehandelte Zellen (100 % Proliferation) und mit Zeocin-behandelte Zellen (0% Proliferation). Anschließend wurde eine XTT/Phenazine Methosulfat Lösung auf die Zellen gegeben und für weitere 4 h inkubiert. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm und der Referenzwellenlänge 630 nm im ELISA Plattenleser (EPOCH, III.1.3) detektiert. Aus drei unabhängigen Experimenten mit Triplikaten wurde die halbmaximale effektive Proteinkonzentration (EC₅₀) mit der „Fitting“-Methode „Sigmodial dose-response“ (variable slope) mit der GraphPad Prism v5 Software (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA) berechnet.

III.2.16 Apoptose-Assay mittels AnnexinV-Bindung

Für den Nachweis pro-apoptotischer Aktivitäten der TTC-basierten Fusionsproteine (TTC-ETA', GrB(R201K)-TTC, TTC-MAPTau, III.2.8.2) wurde eine AnnexinV/Propidiumiodid (PI) Färbung durchgeführt. Hierfür wurden $0,5 \times 10^5$ Zellen/ml TTC-reaktiven REH-Zellen und die Mock-transfizierte Kontrollzellen (III.2.5) mit 50 nM der rekombinanten Proteine bzw. den negativen Kontrollproteinen (Mock-ETA', GrB(R201K)-Mock, Mock-MAPTau) und der Positivkontrolle Camptothecin für 72 h bei 37 °C, 5% CO₂ in einem Volumen von 300 µl/Well in einer 24-well Platte inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem Zellkulturüberstand in FACS-Röhrchen pipettiert mit 500 µl 1x Annexin-Puffer (III.1.4) versetzt und bei 500 x g, 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit AnnexinV-Lösung (1:50 Annexin-V-APC (III.1.6) in 1x Annexin Puffer (III.1.4) für 20 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem wiederholtem Waschschrift mit 1x Annexin Puffer wurden die Zellen in 1x Annexin Puffer resuspendiert und 1 µg/ml PI kurz vor der Messung am FACSVerse™ (BD Biosciences) hinzugefügt. Aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils Duplikaten wurden die Daten dokumentiert. Es erfolgte eine statistische Auswertung mittels „one way ANOVA, repeated measured“ gefolgt vom Bonferroni Posthoc Test mit der GaphPad Prism v5 Software (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA).

III.2.17 Enzyme-Linked Immuno Spot Assay (ELISpot)

Die spezifische Eliminierung humaner Gedächtnis-B-Zellen durch TTC-ETA' (III.2.8.2) wurde von unseren Projektpartnern am Uniklinikum Münster (Sektion Rheumatologie und Klinische Immunologie) durchgeführt. Für die Detektion der Gesamtheit Antigen-sekretierender Zellen wurden 96-well ELISA-Platten (Greiner Bio-One) über Nacht bei 4 °C mit Ziege anti-human kappa Antikörper/Ziege anti-human lambda Antikörper (kurz als anti-IgG Antikörper betitelt, SouthernBiotech, AL, USA) beschichtet. Als weitere Beschichtungsmaterialien wurden 20 Lf/ml Tetanus Toxoid (TT, Statens Serum Institute, Copenhagen, Denmark) oder 20 µg/ml rekombinantes TTC-Protein (III.2.8.2) verwendet. Nach einem Waschschrift mit 150 µl/well PBS + 0,5% (w/v) BSA wurden die ELISA-Platten mit 200 µl/well PBS + 3% (w/v) BSA + 5% (v/v) FCS für 1 h bei 37 °C, 5%CO₂ inkubiert. Die polyklonal aktivierten B-Zellen (III.2.7) wurden in Duplikaten mit einer Zellkonzentrationsreihe von 5-1.000 Zellen/Vertiefung bei den Platten, die mit dem anti-IgG Antikörpern beschichtet wurden und 2.000 – 100.000 Zellen/Vertiefung bei den TT bzw. TTC beschichteten Platten ausgesät. Nach einer Inkubation von acht Stunden bei 37 °C, 5% CO₂ wurden die Platten sechsmal mit 150 µl PBS gewaschen und anschließend wurden die Spots mit AP-konjugiertem Ziege anti-human IgG Antikörper (Southern Biotec) für eine Stunde bei 37 °C, 5% CO₂ inkubiert und mit 2-amino-2-methyl-1-propanol (AMP) Puffer inklusive 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (BCIP)/Nitroblue tetrazolium (NBT) visualisiert. Die einzelnen Spots wurden gezählt und die Frequenz der TT bzw. TTC-IgG sezernierenden Zellen (ASC) für jeden Spender berechnet.

III.2.18 Konfokalmikroskopie

Das Internalisierungsverhalten der TTC-Fusionsproteine wurde unter Zuhilfenahme des fluoreszenten Proteins SNAP-TTC-BG-488 (III.2.9) an TTC-reaktiven murinen Hybridomzellen (III.1.9) durchgeführt. Dafür wurden die Zellen mit je 1 µg des gekoppelten SNAP-TTC Proteins bei 4 °C bzw. 37 °C für 15-90 min inkubiert. Für die Messung am OPERA® System Hochdurchsatz-Analysator wurden die gefärbten TTC-reaktiven Hybridomzellen nach der Inkubation mit den Proteinen, mit 1x PBS gewaschen, und mit 2% (v/v) Paraformaldehyd (in PBS) für 15 min fixiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von HOECHST 33342 (4 µg/µl Endkonzentration in PBS) und die Detektion der Fluoreszenz mit dem OPERA® Hochdurchsatz-Analysator. Zur Bestimmung des Internalisierungsverhaltens des SNAP-TTC-BG-647 Proteins (III.2.9) an TTC-reaktiven REH-Zellen (III.2.5) wurde wie oben beschrieben inkubiert und anschließend mit HOECHST 33342 (4 µg/µl Endkonzentration) der Zellkern gefärbt. Die Zellen wurden mit FACS-Färbepuffer (III.1.4) gewaschen und ohne Fixierung auf Objektträger (Menzel-Gläser, Thermo Scientific) ausgestrichen und mit dem Konfokal-Lasermikroskop (Leica, Wetzlar) mit der Software LAS AF aufgenommen.

III.2.19 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Seren und Urinproben von SLE-Patienten mit aktiver Nephritis (NS), Nephritis in Remission (NR), aktiver Erkrankung ohne Nierenbeteiligung (S) und gesunden Kontrollen (G) bzw. Seren und Urinproben von erkrankten K14-CD40L tg Mäusen im Vergleich zu WT- Mäusen (freundlicherweise von Prof. Karin Loser, Uniklinikum Münster, Klinik für Hautkrankheiten zur Verfügung gestellt) wurden mittels ELISA Varianten A und B (Tabelle 12) auf anti-LAMa1-Antikörper getestet. Die Waschschriffe erfolgten dreimalig mit PBS + 0,25% (v/v) Tween20. Die statistische Signifikanz wurde mithilfe des Kruskal-Wallis Tests und des Dunn's Multiple Comparison Tests berechnet. Diese Experimente wurden von unseren Projektpartnern am Uniklinikum Münster, Sektion Rheumatologie und Klinische Immunologie durchgeführt.

Die Antikörperreaktionen aus den Mausseren von erkrankten K14-CD40L tg und Wildtyp-Mäusen, Mäusen ohne Erkrankung auf rekombinanten Maus-spezifischen Laminin-Proteinvarianten (mLAMa1-G5, mLAMa1-V6; III.2.8.2) wurde mittels ELISA Variante C durchgeführt. Die jeweiligen Proteine sowie das Kontrollprotein TTC wurden in Duplikaten eingesetzt und die Daten von zwei unabhängigen Experimenten (n=2) ausgewertet. Die Detektion der mLAMa1-basierten Proteine mit Hybridom-Überständen erfolgte nach ELISA Variante D. Die jeweiligen Proteine sowie das Kontrollprotein Laminin wurden in Duplikaten eingesetzt und die Daten wurden von drei unabhängigen Experimenten (n=3) ausgewertet.

Tabelle 12: ELISA Varianten

Abkürzungen: BSA = bovine serum albumin, HRPO = Horseradish Peroxidase, mLAMa1 = murine Laminin α1-Kette, pNPP = 4-Nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate, tg = transgen

Variante	Coating	Blocking	Primär-AK	Sekundär-AK	Substrat
----------	---------	----------	-----------	-------------	----------

V.1.1	Herstellung und Charakterisierung TTC-basierter Fusionsproteine an TTC-reaktiven Hybridomzellen und humanen B-Lymphozyten	74
V.1.2	Herstellung und <i>in-vitro</i> Charakterisierung TTC-basierter humaner Fusionsproteine an den neu generierten humanen TTC-reaktiven REH-Zellen	79
V.2	Technologietransfer auf ein krankheitsrelevantes Autoantigen beim SLE	84
V.2.1	Herstellung und Charakterisierung von humanen Laminin α 1-Proteinvarianten.....	84
V.2.2	Herstellung und Charakterisierung von murinen Laminin α 1-Proteinvarianten	87
V.3	Ausblick	89
VI	Literaturverzeichnis.....	92
VII	Anhang	102
VII.1	Vektorkarten und Sequenzen	102
VII.1.1	Vektorkarten.....	102
VII.1.2	Sequenzen	106
VII.2	Abkürzungsverzeichnis	111
VII.3	Index der Abbildungen und Tabellen.....	114
VII.3.1	Abbildungsverzeichnis	114
VII.3.2	Tabellenverzeichnis.....	116
VII.4	Danksagung.....	117
VII.5	Lebenslauf	119

IV Ergebnisse

IV.1 Charakterisierung Antigen-basierter Fusionsproteine

Als Modellantigen für die Zellbindedomäne wurde das Tetanustoxin Fragment C ausgewählt. Es dient bei der Herstellung neuartiger Fusionsproteine als Zielzell-spezifische Bindedomäne und soll helfen, innovative Therapieansätze zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen voranzutreiben. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher sowohl therapeutisch wirksame als auch diagnostisch relevante TTC-Fusionsproteine hergestellt und nachfolgend charakterisiert.

IV.1.1 Herstellung und *in vitro*-Charakterisierung TTC-basierter Fusionsproteine

Die cDNA-Sequenz des TTC (III.1.8, GenBank FJ917402.1) wurde für die Expression in *E. coli* Codon-optimiert und für die direkte Klonierung in die entsprechenden Zielvektoren mit den Restriktionsschnittstellen *SfiI* und *NotI* versehen (Life Technologies). Die cDNA wurde über die genannten Restriktionsschnittstellen in den prokaryotischen Expressionsvektor pBM und den eukaryotischen Expressionsvektor pMS (III.1.8, Abbildung 6) kloniert. So entstanden die Fusionsproteine TTC-ETA', SNAP-TTC und ein TTC-Protein ohne Effektor-domäne, welches als Negativkontrolle verwendet wurde.

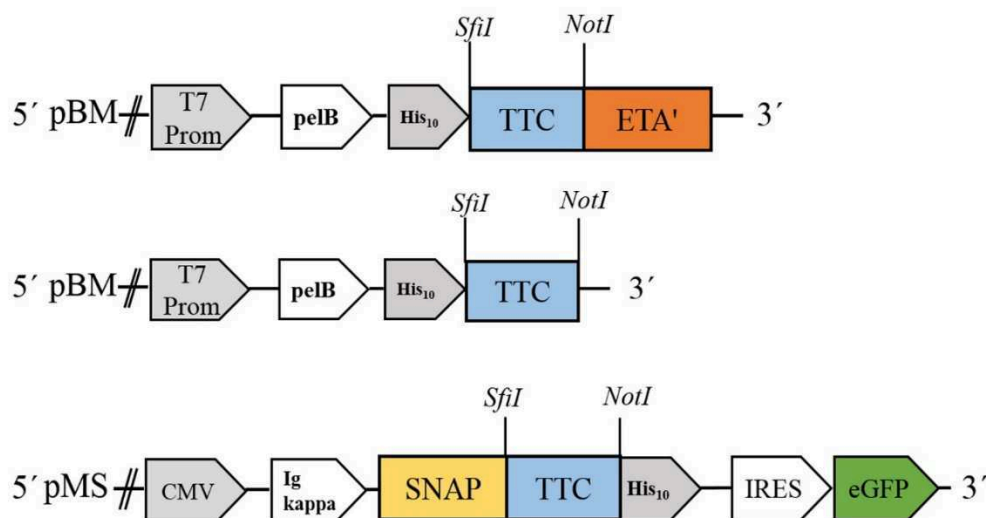


Abbildung 6: Expressionsvektoren der TTC-basierten Fusionsproteine.

Schematische Darstellung der Expressionskassetten für die prokaryotische (pBM) und eukaryotische Expression (pMS). Die kodierende Sequenz des Antigens TTC (III.1.8) wurden über die Restriktionsschnittstellen *SfiI/NotI* in die Expressionsvektoren pBM und pMS (III.1.8) kloniert. Die Sekretion des rekombinanten Proteins erfolgt über das pelB Signalpeptid in das bakterielle Periplasma (III.1.7). Im eukaryotischen Expressionssystem erfolgt die Sekretion des rekombinanten Proteins über das Ig-kappa-Signalpeptid in das Kulturmedium transfizierter HEK 293T-Zellen (III.1.9, III.2.4). Der N-terminale (pBM) bzw. C-terminale (pMS) Histidin-Tag dient der Reinigung und Detektion rekombinanter TTC-Proteine. Über das grün-fluoreszierende Reporter Protein (eGFP) erfolgt eine Selektion transfizierter Zellen im eukaryotischen Expressionssystem. Abkürzungen: T7-Prom – T7 Promotor, pelB – Signalpeptid, His-tag – Histidin-Affinitäts-tag (10x), TTC – Tetanustoxin Fragment C, ETA' – Deletionsmutante des *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A, CMV – konstitutiver aktiver Promotor für das Cytomegalovirus (CMV), Ig-kappa – Signalpeptid zur Sekretion der Proteine in den Zellkulturüberstand, IRES – „internal ribosomal entry site“, eGFP- „enhanced“ grün-fluoreszierendes Protein

Die Expression des TTC-ETA' Proteins und der Negativkontrolle erfolgte mittels periplasmatischer Stressexpression in *E.coli* BL21 DE3 Zellen (III.2.8.1). Die Proteine wurden nach Zellaufschluss durch Dialyse umgepuffert und anschließend mittels Affinitätschromatographie (IMAC, III.2.8.2) gereinigt. Die Proteinausbeute wurde unter Zuhilfenahme einer BSA-Standardreihe (250-4000 ng) nach SDS-PAGE und „Coomassie Brilliant Blue“ Färbung (III.2.8.3) mithilfe der AIDA Software (III.2.8.5) ermittelt und betrug 1.9 mg/l Bakterienkultur für TTC-ETA' bzw. 1,1 mg/l Bakterienkultur für TTC. Mit der IMAC Reinigung konnte eine Reinheit der Proteine von 63% (TTC-ETA') bzw. 68% (TTC) mittels AIDA Software (III.2.8.5) ermittelt werden.

Das diagnostisch relevante SNAP-TTC Fusionsprotein wurde zur Gewährleistung der Proteinaktivität des SNAP-tags mittels eukaryotischer Expression in HEK 293T Zellen (III.2.4) hergestellt. Nach Sezernierung des rekombinanten Proteins in den Zellkulturüberstand wurde es mittels IMAC (III.2.8.2) mit einer Proteinausbeute von 6 mg/l Kulturüberstand gereinigt. Die gereinigten Proteine wurden elektrophoretisch aufgetrennt und mit „Coomassie Brilliant Blue“ Färbung (III.2.8.3) visualisiert, sowie im Western Blot (III.2.8.4) mit einem α -His Antikörper und einem sekundärem $G\alpha M^{AP}$ Antikörper (III.1.6) nachgewiesen (Abbildung 7A). Die Proteinreinheit nach der IMAC Reinigung konnte mittels der AIDA Software auf 77% bestimmt werden. In der Abbildung 7B sind die Expressionen von TTC (55 kDa, Reihe 2), TTC-ETA' (95 kDa, Reihe 3) und SNAP-TTC (93 kDa, Reihe 4) dargestellt. Die Proteingrößen wurde mithilfe der Software *Clone Manager 9 Professional* (Scientific & Educational Software, USA) theoretisch ermittelt und über den verwendeten Proteinmarker (NEB, III.1.2) im SDS-PAA-Gel bestätigt werden.

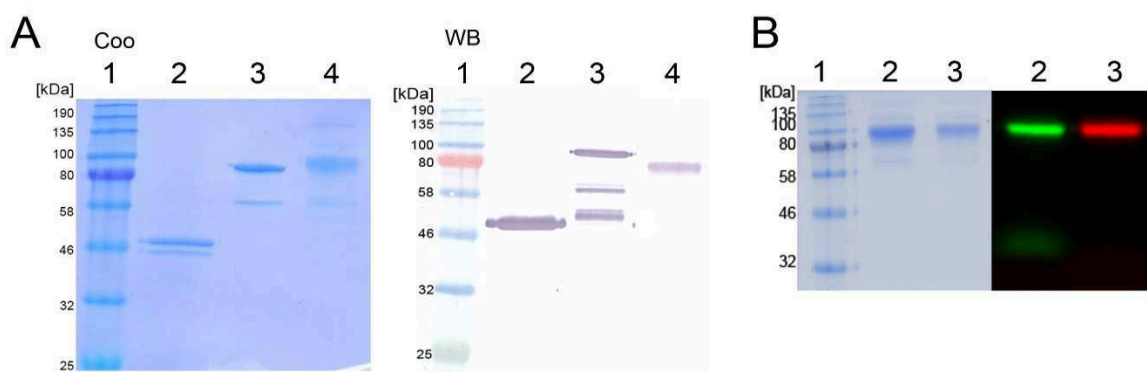


Abbildung 7: Herstellung der TTC-Fusionsproteine und Markierung des SNAP-TTC Proteins mittels BG-modifizierter Fluoreszenzfarbstoffe.

A) Visualisiert wurden die gereinigten TTC-Fusionsproteine nach Auftrennung via SDS-PAGE mittels „Coomassie Brilliant Blue“ Färbung (III.2.8.3, „Coo“). Im Western Blot („WB“, III.2.8.4) wurde mithilfe der α -His/ $G\alpha M^{AP}$ Antikörper (III.1.6, „WB“) die TTC-Fusionsproteine spezifisch nachgewiesen (1 - Color Prestained Protein Standard, III.1.2). Die Proteine wiesen folgende Proteingrößen 2 - TTC: 55 kDa; 3 - TTC-ETA': 95 kDa, 4 - SNAP-TTC: 93 kDa auf.

B) Dargestellt ist die „Coomassie Brilliant Blue“ Färbung der gekoppelten SNAP-TTC Proteine (1 - Color Prestained Protein Standard, III.1.2; 2: SNAP-TTC-BG-488; 3: SNAP-TTC-BG-647, III.2.8.2, III.2.9), sowie die Aufnahme der Fluoreszenzfarbstoffe der gekoppelten SNAP-TTC Proteine im Maestro Bildgebungsgerät unter Verwendung des blauen Filtersets (500-700 nm) für den grünen Fluoreszenzfarbstoff BG-488 und des gelben Filtersets (630 – 850 nm) für den BG-647 Farbstoff (III.2.9). Die Abbildung wurde nach Klose *et al.* [137] erstellt.

Für den therapeutischen und diagnostischen Einsatz der hergestellten TTC-Fusionsproteine ist die spezifische Zellbindungseigenschaft der Proteine an TTC-reaktiven Zellen notwendig. Aufgrund dessen wurde der Zellbindungsnachweis der Proteine auf den murinen TTC-reaktive Hybridomzellen 5E4 (III.1.9) durchgeführt. Als Kontrollzelllinie diente eine murine Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG)-reaktive Hybridomzelllinie (8.18-C5, III.1.9). Mittels Durchflusszytometrie (III.2.12) konnte die spezifische Zellbindung des Kontrollproteins TTC sowie des TTC-ETA' Fusionsproteins unter Verwendung eines α -His-488 Antikörpers (III.1.6) nachgewiesen werden (Abbildung 8A & B). Gleichzeitig konnte die spezifische Zellbindung des gekoppelten SNAP-TTC-647 Proteins auf den TTC-reaktiven Hybridomzellen 5E4 (Abbildung 8C) im Vergleich zur Kontrollzelllinie (Abbildung 8D) detektiert werden. Die Kopplung des Fluoreszenzfarbstoffes (III.2.9) an das SNAP-TTC Protein beeinflusst nicht dessen spezifische Bindungsaktivität an den Zielzellen (Abbildung 8C).

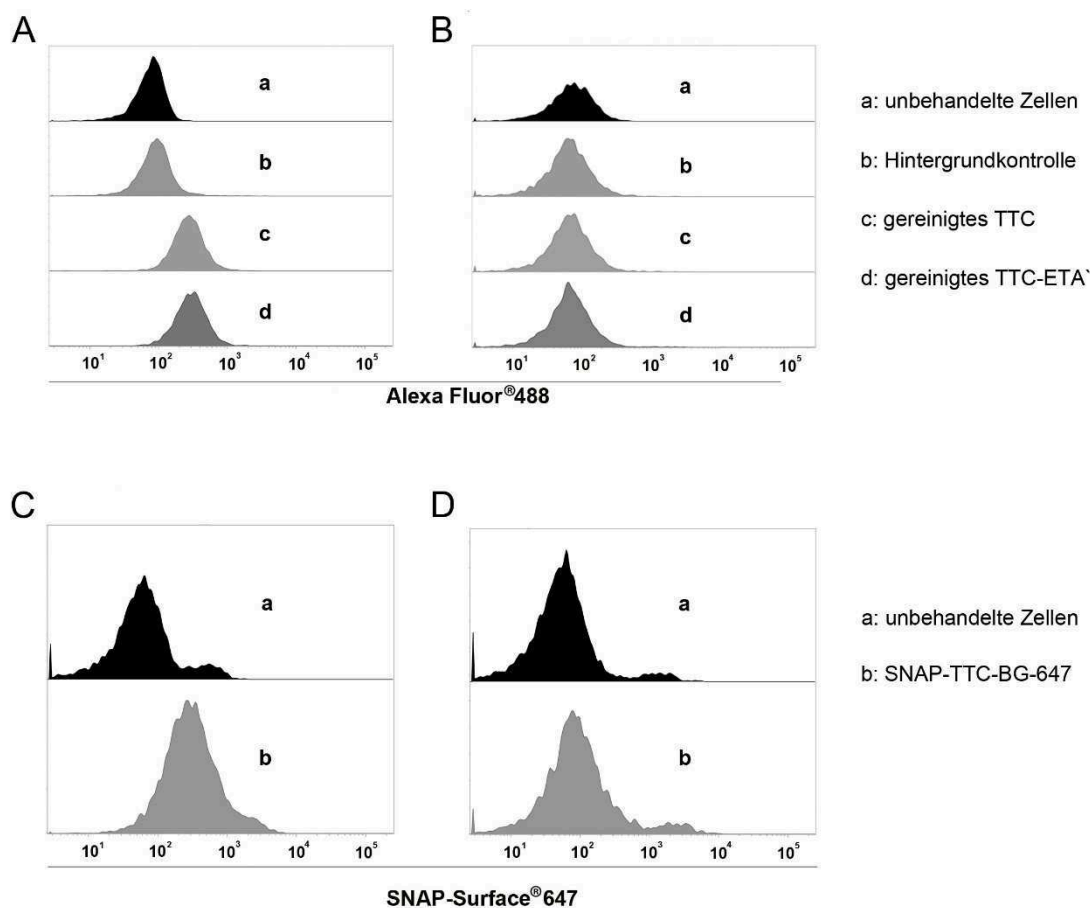


Abbildung 8: Bindungsanalyse der rekombinanten TTC-Fusionsproteine an Hybridomzellen.

A und **B**) Äquimolare Mengen (100 nM) der gereinigten Proteine TTC und TTC-ETA' (III.2.8.2) wurden für die Zellbindungsanalyse mittels Durchflusszytometrie (III.2.12) auf TTC-reaktiven Hybridomzellen 5E4 (**A**, III.1.9) und Kontroll-Hybridomzellen 8.18-C5 (**B**, III.1.9) verwendet. Die Detektion der Bindung erfolgte mittels des α -His-488 Antikörpers (III.1.6). Dabei dienten nicht gefärbte Zellen (unbehandelt) und mit α -His-488 behandelte Zellen (Hintergrundkontrolle) als Kontrollen.

C und **D**) Analyse der Zellbindeaktivität des SNAP-TTC-BG-647 Proteins (III.2.9) auf TTC-reaktiven

Hybridomzellen (C) im Vergleich zu Kontroll-Hybridomzellen (D) in Bezug auf unbehandelte Zellen. Die Abbildung wurde nach Klose *et al.* [137] erstellt.

Nach der Reinigung des Fusionsproteins SNAP-TTC wurde es mit zwei verschiedenen BG-modifizierten Fluoreszenzfarbstoffen markiert (III.2.9). Die erfolgreichen Kopplungsreaktionen der Farbstoffe BG-488 bzw. BG-647 (III.1.10) an das Fusionsprotein wurde visuell im SDS-PAA-Gel (III.2.8.3) mithilfe des Maestro Bildgebungsgeräts nachgewiesen (III.2.9, Abbildung 7B). Durch die anschließende „Coomassie Brilliant Blue“ Färbung der gekoppelten SNAP-TTC Proteine im SDS-PAA-Gel wurde die Zugehörigkeit der detektierten Fluoreszenzsignale zu den gekoppelten SNAP-TTC Proteinen bestätigt.

Wichtig für die *in vitro*-Charakterisierung des TTC-ETA' Proteins als therapeutisches Protein ist neben dem Zellbindungsnachweis ebenfalls die Dokumentation der Internalisierung des Protein-Rezeptorkomplexes. Hierfür wurde zunächst die Anzahl der TTC-reaktiven B-Zellrezeptoren auf der Zelloberfläche der Hybridomzellen 5E4 mittels durchflusszytometrischen Analysen unter Verwendung des GαMPE Antikörpers und der „QuantiBrite^{PE} Beads“ (BD Bioscience) detektiert (III.2.14).

Die TTC-reaktive Hybridomzelllinie 5E4 weist eine quantitative B-Zellrezeptordichte von 1645 ± 229 BZR ($\bar{x} \pm$ Standardfehler der Mittelwerte, SEM) auf der Zelloberfläche auf.

Aufgrund der niedrigen Rezeptoranzahl sollte durch Zugabe von Stimulierungsfaktoren, wie das Lipopolysaccharid (LPS) und das rekombinante TTC Protein über die Kombination aus TLR- und BZR-Signalkaskade Einfluss auf die Erhöhung der BZR auf der Zelloberfläche der Hybridomzellen genommen werden. Hierfür wurden die Hybridomzellen mit verschiedenen Konzentrationen von LPS und TTC im R10 Zellkulturmedium (III.1.5) inkubiert und nach 24 h bzw. 48 h die Anzahl der BZR auf der Oberfläche mittels durchflusszytometrischer Analysen (III.2.14) bestimmt (Abbildung 9).

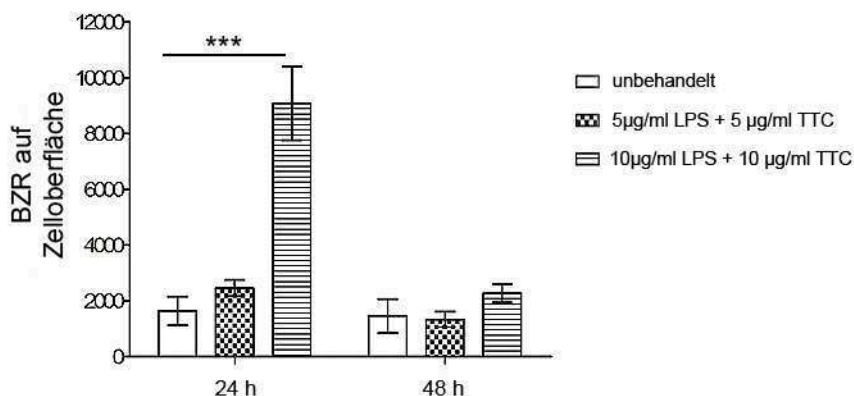


Abbildung 9: Quantitative Bestimmung der B-Zellrezeptoren auf der Zelloberfläche von TTC-reaktiven Hybridomzelllinie 5E4 vor und nach Zellstimulation.

Die Anzahl der BZR auf der Zelloberfläche wurde mittels Durchflusszytometrie (III.2.12) unter Verwendung des GαM^{PE} Antikörpers (III.1.6) und der „QuantiBrite^{PE} Beads“ (III.1.6) bestimmt. Anhand der Kalibrierreihe (lineare Regression) wurden die gemessenen durchschnittlichen geometrischen Fluoreszenzintensitäten (MFI) auf die Rezeptoranzahl berechnet. Nach Stimulierung der Zellen mit äquimolare Mengen je 5 µg/ml bzw. 10 µg/ml an Lipopolysaccharid (LPS) von *E. coli* und dem rekombinanten TTC-Protein (III.2.8.2) wurde die Anzahl der BZR auf den Hybridomzellen bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SEM) von Duplikaten

I Einleitung

I.1 Systemischer Lupus Erythematoses (SLE)

Rheumatische Autoimmunerkrankungen (AIK) treten zu 5% in der Bevölkerung auf [1]. Als Auslöser werden verschiedene Umweltfaktoren (Tabakrauch, ultraviolette Strahlung), genetische und epigenetische Veranlagungen („Human Leukocyte Antigen“-Polymorphismen, DNA-Methylierung und Histon-Modifikationen), Infektionen (Eppstein-Barr Virus) sowie immunregulatorische Faktoren (Unregelmäßigkeiten in der B- und T-Zell Signalkaskade) diskutiert, jedoch ist nicht ein Faktor alleine für die Ausprägung einer Autoimmunerkrankung verantwortlich [1-5]. Autoimmunerkrankungen können durch bestimmte Veränderungen in der B-Zell-Entwicklung entstehen, wodurch die Sekretion von pathogenen Autoantikörpern und die Aktivierung von T-Zellen Entzündungsprozesse bis hin zu Organschädigungen hervorrufen [2]. Ein bewährtes diagnostisches Vorgehen bei Patienten zahlreicher AIK ist die Bestimmung von Autoantikörpern in Patientenseren. Unterschieden werden organspezifische und systemische AIK. Zu den organspezifischen AIK zählen z.B. der Diabetes mellitus Typ 1, die multiple Sklerose (MS) und die Hashimoto-Thyroiditis. Zu den systemischen AIK zählen unter anderem die rheumatoide Arthritis (RA), das Sjögren-Syndrom und der systemische Lupus Erythematoses (SLE) [2, 6]. Beim SLE handelt es sich um den Prototyp einer chronischen AIK mit Entzündungssymptomen, welche durch Interferonausschüttung und Komplementaktivierung, hervorgerufen und verstärkt durch Autoantigen/Autoantikörperkomplexe gekennzeichnet ist und eine Gewebeerstörung in multiplen Organen zur Folge hat [7, 8]. Mehr als 100 verschiedene Autoantikörper können beim SLE auftreten, die unter anderem gegen Zellkernkomponenten, Phospholipid-assoziierte Proteine, Endothelmembran-Komponenten und Fragmente des Komplementsystems gerichtet sein können [3, 7]. Für die Diagnose des SLE werden die Titer der anti-nukleären Antikörper (ANA) und anti-Doppelstrang (ds)-DNA Antikörper im Patienten-Serum bestimmt [3, 9, 10]. Dabei sind ANAs bereits detektierbar, bevor klinische Manifestationen zu erkennen sind. Durch die Vielzahl an möglichen Autoantikörpern und einen häufigen Wechsel zwischen Ausbruch und Remission tritt SLE klinisch sehr heterogen auf.

SLE ist gekennzeichnet durch eine fehlerhafte angeborene und adaptive Immunantwort. Durch gestörte Toleranz-Kontrollpunkte während der frühen B-Zellentwicklung entsteht eine höhere Anzahl an autoreaktiven, gereiften naiven B-Zellen, was das Risiko der Autoantikörpersynthese erhöht [11, 12]. Hierbei kann der Zusammenbruch von Toleranz-Kontrollpunkten durch das Auftreten bestimmter Infektionen (molekulare Mimikrie) sowie durch die Hyperstimulation anderer Immunzellen hervorgerufen werden. Alternativ können im Zuge der Keimzentrumsreaktion autoreaktive B-Zellen vom IgG Isotyp *de novo* generiert werden [13]. Charakteristisch weisen die SLE Patienten Hypergammaglobulinämie und Immunkomplex-Ablagerungen auf, sodass Gewebeschädigungen in Haut, Niere, Nervengewebe, Blutgefäßen und Lunge auftreten [2, 6, 14]. Besonders die Beteiligung der Nieren oder des zentralen Nervensystems stellen schwerwiegende SLE-Manifestationen dar [15].

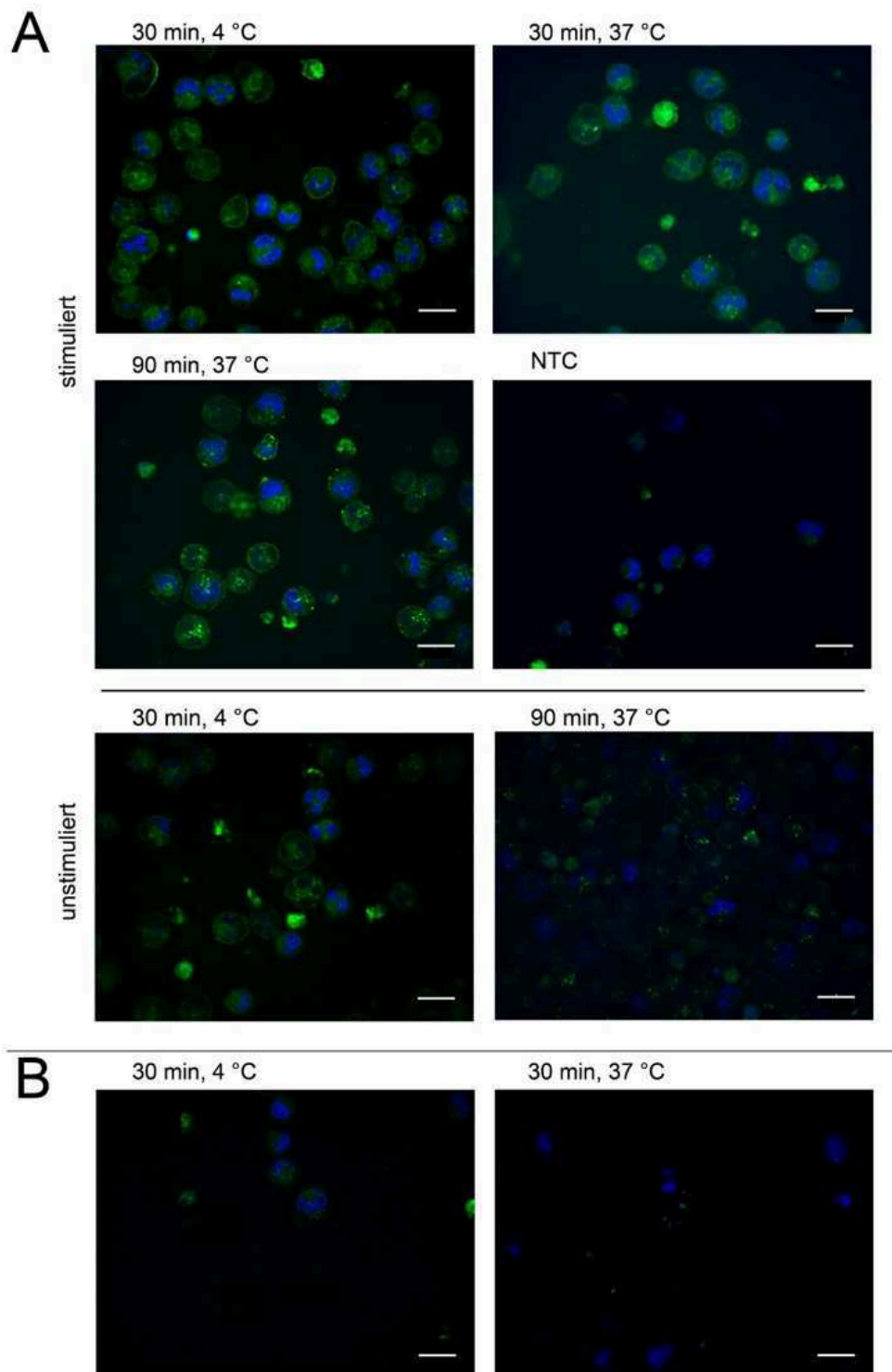


Abbildung 10: Internalisierungsstudie des rekombinanten SNAP-TTC-BG-488 Proteins auf Hybridomzellen.

Mit je 1 μg SNAP-TTC-BG-488 Protein (grün) wurden die Hybridomzellen (III.1.9) bei 4 °C bzw. 37 °C für 30 min bzw. 90 min inkubiert. Die Zellkerne wurden mit HOECHST 33342 (blau) gefärbt. Die Internalisierungsstudien wurden mithilfe des OPERA® Hochdurchsatz-Analysators aufgenommen (III.2.17). In **A**) ist die Internalisierungsstudie an stimulierten TTC-reaktiven Hybridomzellen 5E4 und in **B**) an der Kontrollzelllinie 8.18-C5 dargestellt. Der Maßstabsbalken beträgt 20 μm . Abkürzung: NTC – „no template control“ Zellen ohne Proteinbehandlung.

Zur Bestimmung der zytotoxischen Aktivität des Autoimmuntoxins wurden die Hybridomzellen mit einer seriellen Verdünnung des rekombinanten TTC-ETA'-Proteins sowie mit dem rekombinanten Kontrollprotein TTC über 72 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend erfolgte ein XTT-basierter kolorimetrischer Zellviabilitätsassay (III.2.15). Die halbmaximale effektive Proteinkonzentration (EC₅₀), bezogen auf unbehandelte Hybridomzellen (100% Proliferation) und Zeocin-behandelte Zellen (0% Proliferation), wurde mit der „Fitting“-Methode „Sigmoidal dose-response“ (variable slope) mit der GraphPad Prism Software (III.2.15) berechnet. Wie in Abbildung 11 dargestellt, wurde eine konzentrationsabhängige Reduktion der Proliferation TTC-reaktiver Hybridomzellen nach Behandlung mit dem TTC-ETA' Protein mit einer halbmaximalen effektiven Konzentration EC₅₀ von $1,3 \pm 0,4$ nM ($\bar{x} \pm SD$, n=3) ermittelt. Die Behandlung mit dem rekombinanten TTC-Kontrollprotein zeigte keinen Effekt auf das Proliferationsverhalten der TTC-reaktiven Hybridomzellen. Für beide rekombinanten TTC-basierten Proteine konnte kein unspezifischer zytotoxischer Effekt auf den Kontroll-Hybridomzellen 8.18-C5 detektiert werden (Abbildung 11).

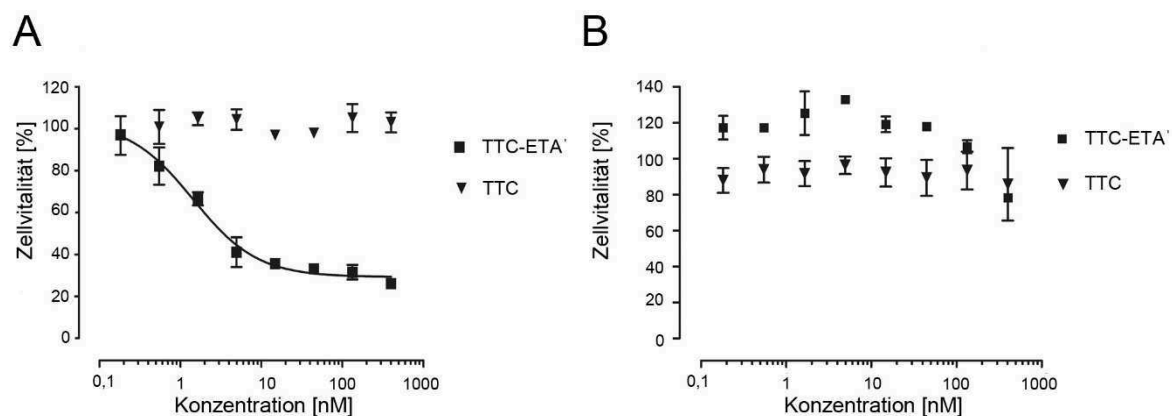


Abbildung 11: Zytotoxische Aktivität TTC-basierter Proteine auf verschiedenen Hybridomzellen.

Die TTC-reaktiven Hybridomzellen 5E4 (A, III.1.9) und die Kontroll-Hybridomzellen 8.18-C5 (B, III.1.9) wurden mit einer seriellen Verdünnung der rekombinanten Proteine (TTC, TTC-ETA', III.2.8.2) über 72 Stunden bei 37 °C, 5% CO₂ inkubiert (III.2.15). Anschließend erfolgte eine Zugabe von 50 µl XTT/Phenazine Methosulfat Lösung und eine Inkubation für weitere 4 Stunden. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm und der Referenzwellenlänge 630 nm detektiert (III.2.15). Die halbmaximale effektive Proteinkonzentration (EC₅₀) wurde, bezogen auf unbehandelte Hybridomzellen (100% Proliferation) und Zeocin-behandelte Zellen (0% Proliferation), mit der „Fitting“-Methode „Sigmoidal dose-response“ (variable slope) mit der GraphPad Prism Software berechnet. Es sind die Mittelwerte ($\bar{x} \pm SD$) von Triplikaten aus drei unabhängigen Messungen dargestellt (n=3). Die Abbildung wurde nach Klose *et al.* [137] erstellt.

IV.1.2 *Ex vivo*-Charakterisierung TTC-basierter Proteine auf humanen Gedächtnis-B-Zellen

Durch *in vitro*-Studien mit den murinen TTC-reaktiven Hybridomzellen 5E4 wurden wichtigen Eigenschaften wie Zellbindung, Internalisierung und spezifische Zytotoxizität auf Zielzellen des Fusionsprotein 'TTC-ETA' analysiert. Weiterführend wurde nun das therapeutische Potentials des TTC-ETA' Fusionsproteins auf humane Gedächtnis-B-Zellen in *ex vivo*-Analysen untersucht. Hierbei lag der Fokus auf dem Nachweis der spezifischen Zellbindung und Zytotoxizität des Immuntoxins auf CD27⁺ Gedächtnis-B-Zellen.

Bevor die Depletionswirkung des TTC-ETA' Fusionsproteins ermittelt wurde, erfolgte die Analyse der Zellbindung des SNAP-TTC Fusionsproteins (Abbildung 7, IV.1.1) auf isolierte humane CD19-positive B-Lymphozyten. Dabei wurde nach einer intrazellulären Färbung mittels Saponin 0,01% TTC-reaktive CD19⁺ B-Zellen aus der Gesamtheit der B-Zellen mittels durchflusszytometrischer Untersuchungen (III.2.13) wiederholt detektiert und repräsentativ in der Abbildung 12 dargestellt.

Nach Überprüfung des spezifischen Zellbindungsverhalten des rekombinanten TTC-Proteins an humanen Plasmazellen, konnte nun im nächsten Schritt die spezifische Depletionswirkung des Fusionsproteins auf die Tetanus-reaktiven Gedächtnis-B-Zellen analysiert wurden.

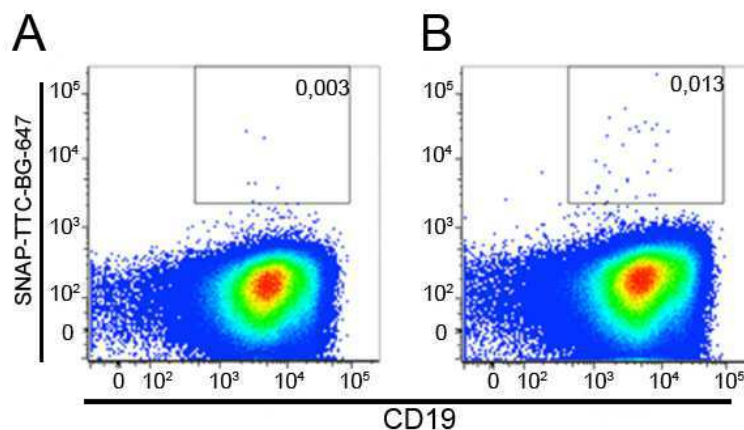


Abbildung 12 Bindungsanalyse SNAP-TTC-BG-647 Protein an polyklonal aktivierten CD19⁺ humanen B-Zellen

Für die Zellbindungsanalyse wurde dem Projektpartner am Uniklinikum Münster das gereinigte und Fluoreszenz markierte SNAP-TTC-BG-647 Protein (III.2.8.2, III.2.9) zur Verfügung gestellt. Mit dem SNAP-TTC-BG-67 (1:25 verdünnt) wurde eine Oberflächenfärbung (A) bzw. eine intrazelluläre Färbung mit Saponin (B) an den polyklonal aktivierten CD19⁺ B-Zellen (nach viertägiger Kultivierung mithilfe durchflusszytometrischer Untersuchungen (III.2.13) durchgeführt. Diese Ergebnisse wurde von den Projektpartnern am Uniklinikum Münster, Sektion Rheumatologie und Klinische Immunologie Innere Medizin D unter Leitung von Prof. Annett Jacobi durchgeführt und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Für den Nachweis der Eliminierung von Tetanus-reaktiven Gedächtnis-B-Zellen wurden ELISpot Analysen durchgeführt. Dabei wurde die Möglichkeit genutzt, dass Antigen-erfahrene B-Zellen (Gedächtnis-B-Zellen) eine niedrige Aktivierungsschwelle aufweisen und z.B. durch Interleukin-21, welches normalerweise durch folliculäre T-Helferzellen produziert wird, rasch in Plasmazellen

differenzieren können [138]. Weiterhin wurden die Gedächtnis-B-Zellen über den „Toll-like“ Rezeptor (TLR) mit synthetischen Oligonukleotiden (CpGs) in Antikörper-sezernierende Zellen (ASZ) [139] *ex vivo* differenziert. Diese polyklonale Aktivierung der Gedächtnis-B-Zellen erfolgte während der Kultivierung der frisch isolierten humanen Zellen (III.2.7). Am zweiten Tag der Kultivierung erfolgte die Behandlung der Zellen mit 10 nM des rekombinanten TTC-ETA' oder dem Kontrollprotein TTC während der weiteren 48 h Kultivierungszeit. Anschließend wurde die Frequenz der Gesamtheit IgG-sekretierender Zellen, als auch die Frequenz an anti-Tetanustoxin (TT)-IgG bzw. anti-TTC IgG sekretierenden Zellen untersucht. Für die Analyse der TT- bzw. TTC-sekretierenden Zellen wurden die ELISpot Platten mit dem Tetanustoxin bzw. mit dem rekombinanten TTC Protein beschichtet und anschließend wurden die behandelten, polyklonal aktivierten B-Zellen für 8 h in diesen Platten kultiviert (III.2.7). Die Abbildung 13 zeigt die Auswertung der ELISpot Analyse. Die Behandlung der polyklonal aktivierten B-Zellen mit den rekombinanten TTC-Fusionsproteinen hatte keinen Einfluss auf die allgemeine IgG Antikörper Sekretion (Abbildung 13A), sodass keine unspezifische Wirkung des Autoimmuntoxins auf andere Antikörper-sekretierende Zellen dokumentiert werden konnte. Bei der Verwendung des Tetanustoxin als Beschichtungsmaterial der ELISpot Platten mit nachfolgender Bestimmung der TT-spezifischen Gedächtnis-B-Zellen konnte eine TT-IgG Frequenz von $0,7 \pm 0,6\%$ ($\bar{x} \pm SD$) mit dem TTC Kontrollprotein ermittelt werden (Abbildung 13B). Wurden die polyklonal aktivierten Zellen mit dem Autoimmuntoxin TTC-ETA' behandelt, konnte eine Reduktion der TTC-IgG Frequenz auf $0,4 \pm 0,3\%$ ($\bar{x} \pm SD$) dokumentiert werden (Abbildung 13B). Bei der Verwendung des rekombinanten TTC Proteins als Beschichtungsmaterial für die ELISpot Platten konnte ebenfalls ein Eliminierungseffekt durch die reduzierte Frequenz der TTC-IgG Antikörper nachgewiesen werden. Hierbei konnte eine Reduzierung der TTC-IgG Frequenz von $0,1 \pm 0,12\%$ ($\bar{x} \pm SD$) auf $0,02 \pm 0,03\%$ ($\bar{x} \pm SD$) mit $p = 0,0156$ im Vergleich zum Kontrollprotein detektiert werden (Abbildung 13D).

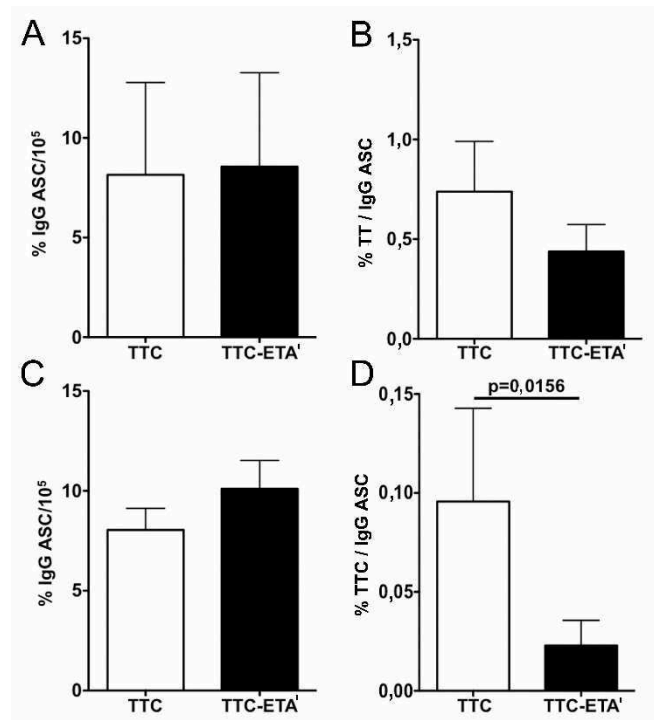


Abbildung 13: Zytotoxische Aktivität des rekombinanten TTC-ETA' Proteins auf Tetanustoxin-spezifischen humanen Gedächtnis-B-Zellen nach polyklonaler Stimulation.

Die Frequenz der IgG- (A,C), der Tetanustoxin- (TT) (B) und der TTC-spezifischen IgG (D) Antikörper sekretierende Zellen (ASC) wurden am Tag 2 nach polyklonaler Aktivierung (III.2.7) mit 10 nM des rekombinanten TTC-ETA'-Proteins bzw. des Kontrollproteins TTC (III.2.8.2) inkubiert. An Tag 4 erfolgte die ELISpot Analyse (III.2.17) zur Detektion der Frequenzen der Antikörper-sekretierenden Zellen. Die Daten ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) sind aus fünf unabhängigen Experimenten mit TT als Beschichtungsmaterial (n=5) und aus sieben unabhängigen Experimenten mit rekombinanten TTC als Beschichtungsmaterial (n=7) dargestellt. Die statistische Analyse wurde mithilfe des *Wilcoxon matched-pairs signed rank* Test durchgeführt. Die Experimente wurden am Uniklinikum Münster, Sektion Rheumatologie und Klinische Immunologie Innere Medizin D unter Leitung von Prof. Annett Jacobi mit dem zur Verfügung gestellten TTC und TTC-ETA' Proteinen durchgeführt und wurden für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Die Abbildung wurde nach Klose *et al.* [137] erstellt.

IV.2 Charakterisierung humaner Effektordomänen

Im Anschluss an die *in vitro* und *ex vivo*-Charakterisierung des Autoimmuntoxins TTC-ETA' wurde die Weiterentwicklung des Autoimmuntoxins bearbeitet. Hierbei erfolgte ein Austausch der bakteriellen toxischen Effektordomäne hin zu humanen zytolytischen Proteinen. Entsprechend wurden neue zytolytische Fusionsproteine mit TTC als Zellbindedomäne generiert und *in vitro* charakterisiert.

Als humane Effektordomäne wurde zum einen die mutierte Variante des Granzym B GrB(R201K), bei der durch den Aminosäureaustausch eine Resistenz gegenüber dem natürlichen Inhibitor PI-9 vorhanden ist [96], verwendet. Als weitere Effektordomäne wurde eine Variante des Mikrotubuli-assoziierten Proteins Tau (MAPTau) mit deletierten Phosphorylierungsstellen [84], ausgewählt. Diese mutierte MAPTau Variante bindet dauerhaft an Mikrotubuli, sodass der Ab- und Aufbaumechanismus der Mikrotubuli während der Mitose gestört wird.

Die SLE-Patienten weisen eine hohe Morbidität auf, welche vor allem durch eine häufig auftretende Niereninsuffizienz hervorgerufen wird. Im Zusammenhang mit Folge-Infektionen, Herz-Kreislaufkrankungen, Krebs sowie der aktiven SLE-Erkrankung selbst besteht ein drei- bis fünffach erhöhtes Sterberisiko gegenüber der gesunden Bevölkerung [4, 16]. Jedoch ist die Überlebensrate bei SLE-Patienten durch Fortschritte in der Diagnostik, Therapie und Rehabilitation von 50% in den 1950er Jahren auf mehr als 90% (2016) gestiegen [17, 18].

Die Lupusnephritis (LN) ist eine schwere Organ-Manifestation des SLE und tritt bei mehr als 70% der SLE-Patienten auf. LN ist gekennzeichnet durch anti-dsDNA-Antikörperproduktion (70-96% der Patienten) und entzündungsbedingte Schäden der glomerulären, vaskulären und tubulo-interstitiellen Strukturen der Niere [14, 19, 20]. Die glomeruläre Entzündungsprozesse basieren dabei auf Ablagerungen der Autoantikörper und Komplementfaktoren, sowie der Infiltration von neutrophilen Leukozyten. Die Entstehung der LN ist trotz intensiver Studien bislang nicht vollständig geklärt, jedoch werden aktuell zwei Hypothesen diskutiert. Die erste Hypothese besagt, dass sie entweder durch die direkte Bindung von Autoantikörpern an glomeruläre Antigene wie z.B. Kollagen, α -Actinin, Myosin oder Laminin entstehen kann. Unterstützt wird diese Hypothese durch den elektronenmikroskopischen Nachweis erhöhter Mengen an glomerulären extrazellulären Matrixproteinen während der Krankheitsphasen [21, 22]. Bei der zweiten Hypothese geht man von der Entstehung der LN durch die Ablagerung von Immunkomplexen aus, die sich in der Niere insbesondere in den Glomeruli ansammeln und Entzündungsprozesse auslösen. Durch die fehlerhafte Beseitigung der Immunkomplexe lagern sich Nukleosomen an extrazellulären Matrixproteinen oder der mesangialen Matrix an. Dies stimuliert in Verbindung mit Peptid-spezifischen $CD4^+$ T-Zellen die Differenzierung von spezifische B-Zellen zu Plasmazellen und somit die Ausschüttung von DNA-spezifischen Autoantikörpern. Diese sekretierten DNA-spezifischen Autoantikörper binden am freigesetztes Chromatin und sorgen somit für eine Ablagerung der Immunkomplexe an der glomerulären Basalmembran, was ein Nierenversagen zur Folge haben kann [21, 23-28]. Untersuchungen von LN-Patienten und LN-Mausmodellen zeigten, dass die anti-dsDNA Antikörper eine hohe Kreuzreaktivität mit glomeruläre Proteinen wie z.B. α -Actinin und Laminin aufweisen, wodurch direkte Entzündungsreaktionen und nachfolgende Organschädigungen auftreten können [23, 24, 29-31]. In einer Reihe von Studien mit SLE/LN-Patienten sowie entsprechenden Mausmodellen sind Autoantikörper gegen das extrazelluläre Matrixprotein Laminin nachgewiesen worden [26, 29, 32-35].

Laminine sind heterotrimere Glykoproteine bestehend aus jeweils einer α , β und γ Kette, die zusammen eine Kreuz-ähnliche Struktur formen (Abbildung 1). Es wurden 5 α (α 1-5), 3 β (β 1-3) und 3 γ (γ 1-3) Ketten identifiziert, die insgesamt 15 Isoformen bilden. Diese Isoformen sind gewebe- und Entwicklungsstadien-spezifisch [36-38]. Laminine haben verschiedene biologische Funktionen, z.B. sind diese an der Zelladhäsion, -Migration, -Wachstum und -Differenzierung, aber auch an der Tumor-Metastasenbildung und Angiogenese beteiligt [37]. Diese zellulären Funktionen werden durch die

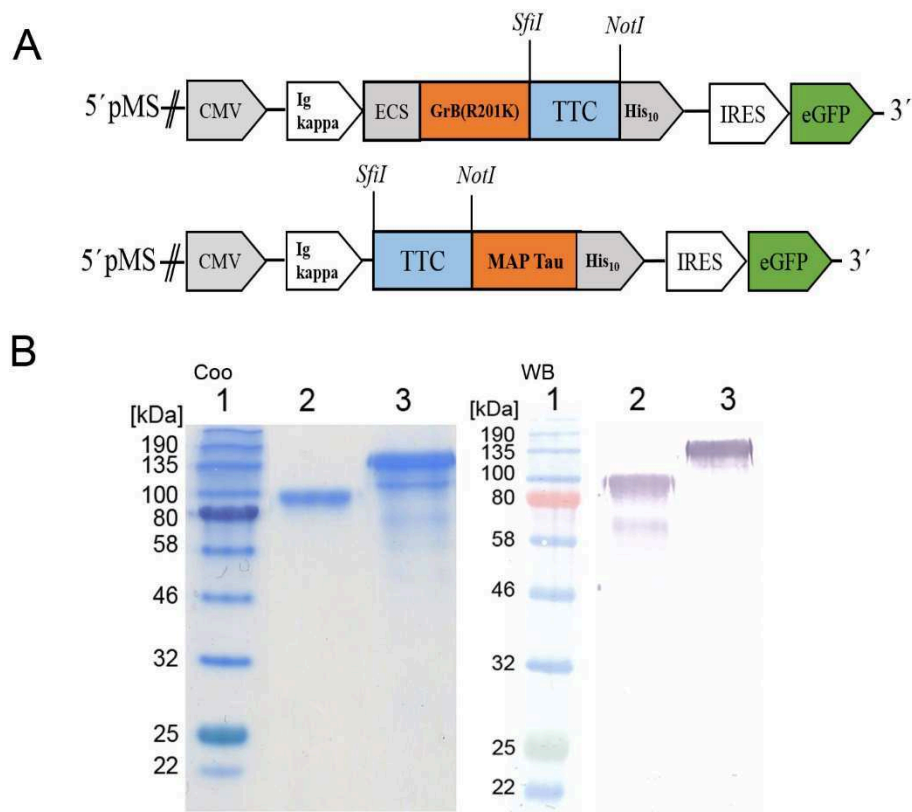


Abbildung 14: Herstellung von EGrB(R201K)-TTC und TTC-MAPTau.

A) Schematische Darstellung der Expressionskassetten für die eukaryotische Expression in HEK 293T Zellen. Die TTC-kodierende Sequenz (III.1.8) wurde über die Restriktionsschnittstellen *SfiI* und *NotI* in die entsprechenden pMS-Expressionsvektoren (III.1.8), welche die humanen Effektordomänen EGrB(R201K) bzw. MAPTau enthalten, eingefügt. Die Sekretion der rekombinanten Proteine erfolgt über das Ig-kappa-Signalpeptid ins Kulturmedium der transfizierten HEK 293T Zellen (III.2.4). Der C-terminale His-tag dient zur Reinigung und Detektion der rekombinanten TTC-Proteine (III.2.8.2, III.2.8.4). Über das grün-fluoreszierende Reporter Protein (eGFP) erfolgte eine Selektion transfizierter Zellen im eukaryotischen Expressionssystem. Abkürzungen: CMV – konstitutiver aktiver Promotor für das Cytomegalovirus (CMV), Ig-kappa – Signalpeptid zur Sekretion des rekombinanten Proteins in den Zellkulturüberstand, ECS - Enterokinase Spaltsequenz, GrB(R201K) – Granzym B-Mutante, TTC – Tetanustoxin Fragment C, MAP Tau – Mikrotubuli-assoziiertes Protein Tau, His₁₀ – Histidin-tag (10x), IRES – „internal ribosomal entry site“, eGFP- „enhanced“ grün-fluoreszierendes Protein

B) Detektion der rekombinanten TTC-Fusionsproteine nach IMAC (III.2.8.2). Die Reinheit der TTC-Fusionsproteine wurde über SDS-PAGE und „Coomassie-Brilliant-Blue“ Färbung („Coo“, III.2.8.3) überprüft (links, 1 - Color Prestained Protein Standard, III.1.2). Im Western Blot („WB“, III.2.8.4) wurden mithilfe der α -His/G α M^{AP} Antikörper (III.1.6) die TTC-Fusionsproteine verifiziert (1 - Color Prestained Protein Standard, III.1.2). Es wurden folgende Proteingrößen EGrB201K-TTC – 80 kDa (Reihe 2) und TTC-MAPTau – 93 kDa (Reihe 3) erwartet.

Erste *in vitro*-Untersuchungen des aktivierten GrB(R201K)-TTC Proteins und des TTC-MAPTau Proteins hinsichtlich ihrer zytotoxischen Wirkung wurde auf den murinen TTC-reaktiven Hybridomzellen 5E4 (III.1.9) mittels dem XTT-Zellviabilitätsassays durchgeführt (III.2.15). Dabei konnte keine zytotoxische Aktivität der Proteine auf den murinen Hybridomzellen detektiert werden (Abbildung 15B), sodass eine Spezies-Spezifität der humanen Effektordomänen besteht.

Somit konnte eine *in vitro*-Charakterisierung der humanen zytolytischen Fusionsproteine mit den TTC-reaktiven Hybridomzellen 5E4 nicht durchgeführt werden.

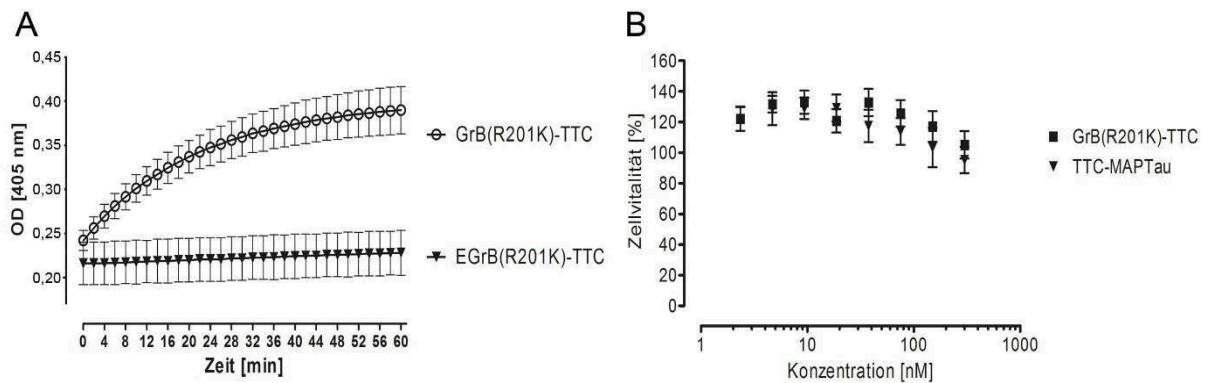


Abbildung 15: In vitro-Charakterisierung der Proteine GrB(R201K)-TTC und TTC-MAPTau.

A) Nach dem Enterokinaseverdau (III.2.10) des EGrB(R201K)-TTC Proteins konnte die Funktionalität der GrB(R201K) Domäne im kolorimetrischen Granzyme B Substratassay (III.2.11) bestätigt werden. Das synthetische Substrate Ac-IETD-pNA wurde mit der aktivierten GrB(R201K)-TTC Protein (○) und dem inaktiven EGrB(R201K)-TTC Protein (▼) inkubiert. Dabei wurde die optische Dichte bei 405 nm über 60 Minuten mit einem 2 min-Intervall dokumentiert.

B) Die zytotoxische Aktivität der humanen Effektordomänen auf TTC-reaktive Maus-Hybridomzellen wurde im XTT-Zellvitalitätsassay (III.2.15) untersucht. Dabei wurden die TTC-reaktiven Hybridomzellen 5E4 (III.1.9) mit einer seriellen Verdünnung der Proteine für 72 h bei 37 °C, 5% CO₂ inkubiert, anschließend eine 50 µl XTT/Phenanzin Methosulfat Lösung hinzugefügt und für weitere 4 Stunden inkubiert. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm und der Referenzwellenlänge 630 nm detektiert (III.2.15). Dargestellt sind die Mittelwerte ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) der Triplikate von drei unabhängigen Experimenten (n=3).

IV.2.2 Generierung von TTC-reaktiven humanen lymphozytischen Zellen

Die *in vitro*-Charakterisierung der TTC-Fusionsproteine mit humanen Effektordomänen (GrB, MAPTau) erforderte ein humanes lymphozytisches Zellsystem. Eine Möglichkeit der Generierung eines solchen zellulären Zellsystems bietet die Verwendung Transposase-basierter Vektoren, welche die gewünschte Zielsequenz (TTC-reaktiver B-Zellrezeptor) in das Genom der entsprechenden Zielzellen integriert. Die Firma NBE Therapeutics GmbH aus Basel stellte uns hierfür freundlicherweise ihre Transpo-mAb® Technologie zur Verfügung. Die Generierung der humanen lymphozytischen Zellen mit TTC-reaktiven B-Zellrezeptoren auf der Zelloberfläche wird in den nächsten Abschnitten dargestellt.

IV.2.2.1 Klonierung der Transposase-basierten Expressionsvektoren

Für die Transfektion der humanen lymphozytischen REH-Zellen mit den Transposase-basierten pPB-LC/HC-eGFP Vektoren (III.1.8) sind die DNA-Sequenzen der variablen Antikörperfragmente von schwerer und leichter Kette (V_L und V_H) aus der TTC-reaktiven Maus-Hybridomzelllinie 5E4 durch eine „V-gene rescue“ PCR (III.2.1.3) identifiziert und amplifiziert worden. Zur Fusion mit der Ig-kappa Signalpeptid-Sequenz wurden die bestätigten V_L und V_H DNA Sequenzen in den Zwischenvektor pTT5 kloniert. Hierfür wurden die V_H/V_L -TTC DNA Sequenzen mit spezifischen

Primern mit den Restriktionsschnittstellen *AgeI/BsiWI* für die leichte Kette und *AgeI/SalI* für die schwere Kette (III.1.8) amplifiziert. Durch den Restriktionsverdau mit *AgeI/BsiWI* bzw. *AgeI/SalI* (III.2.1.5) und die anschließende Ligation (III.2.1.6) in den zuvor linearisierten Zwischenvektor pTT5 (III.1.8) entstanden die Plasmide pTT5-V_H-TTC und pTT5-V_L-TTC.

Durch eine weitere Amplifikation mit den pTT5-V_L/V_H Plasmiden als Ausgangsmaterial wurden die Ig-kappa-V_H/V_L TTC Sequenzen mit den Restriktionsschnittstellen *NotI/NheI* bei der V_H-Sequenz und *NotI/BstBI* bei der V_L-Sequenz versehen. Durch Restriktionsverdau (III.2.1.5) und anschließender Ligation (III.2.1.6) wurden die V_L/V_H-TTC Sequenzen in die zuvor geschnittenen pPB-HC/LC-eGFP Vektoren (III.1.8) kloniert (Abbildung 16).

Durch diese Klonierung der Maus-spezifischen variablen Antikörperfragmente in die Ausgangsvektoren (pPB-HC/LC-eGFP, III.1.8) wurde ein chimärer TTC-reaktiver IgG Antikörper mit humanen Antikörperfragmenten der konstanten Regionen sowie der Transmembran-Region für die Präsentation auf der Zelloberfläche generiert.

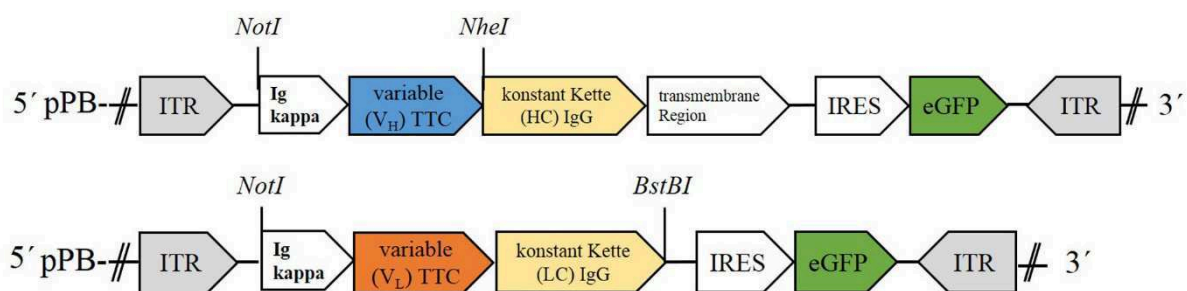


Abbildung 16: Transposase-basierte pPB-V_H/V_L-TTC Expressionsvektoren für die Transfektion von humanen lymphozytischen REH-Zellen.

Die variablen Antikörperfragmente des TTC-reaktiven Antikörpers aus den Maus-Hybridomzellen 5E4 wurden mittels „V-gene rescue“ PCR (III.2.1.3) identifiziert und über eine Zwischenklonierung in den pTT5 Vektor (III.1.8) in die Ausgangsvektoren pPB-AC10-LC/HC-EGFP [125] über die Restriktionsschnittstellen *NotI/NheI* beim V_L-Antikörperfragment bzw. über die Restriktionsschnittstellen *NotI/BstBI* beim V_H-Antikörperfragment kloniert (III.2.1.6).

Abkürzungen: ITR – „inverted terminal repeats“ (Erkennungssequenz für die Transposase), Ig-kappa-Leader - murine Signalsequenz zur Sekretion des Proteins in den Zellkulturüberstand; V_H - variable Antikörperfragmente der schweren Kette, V_L - variable Antikörper Fragmente der leichten Kette, TTC – Tetanustoxin Fragment C, HC – schwere Kette des Antikörpers, LC – leichte Kette des Antikörpers, IRES – „internal ribosomal entry site“ zur Co-Expression des Reporterproteins eGFP, eGFP – „enhanced“ grün-fluoreszierendes Protein.

IV.2.2.2 Transfektion humaner lymphozytischer REH-Zellen und Anreicherung positiv transfizierter Zellen

Nach Bestätigung der Sequenzen der klonierten pPB-V_L/V_H-TTC-EGFP Vektoren (III.2.1.10) erfolgte eine Co-Transfektion (III.2.5) der humanen lymphozytischen REH-Zellen zusammen mit dem pcDNA3.1-hyPB Vektor, welcher die DNA Information für die *piggyBac* Transposase enthält. Mittels

Elektroporation (III.2.5) konnte eine Transfektionsrate von ~7% bezogen auf das GFP Reporterprotein erzielt werden (Abbildung 17A). Die Selektion TTC-reaktiver REH-Zellen erfolgte über das grün-fluoreszierende Reporterprotein eGFP und über die Bindung des α -Igkappa-PE-Cy7 Antikörpers (III.1.6) bzw. des SNAP-TTC-BG-647 Proteins (III.2.9) an den TTC-reaktiven IgG Oberflächenrezeptoren (Abbildung 17B). Von den ~7% GFP-positiven Zellen wurden 2% positiv auf den TTC-reaktiven B-Zellrezeptor unter Verwendung des SNAP-TTC-BG-647 Proteins (III.2.9) in der durchflusszytometrischen Analyse (III.2.12) detektiert (Abbildung 17B).

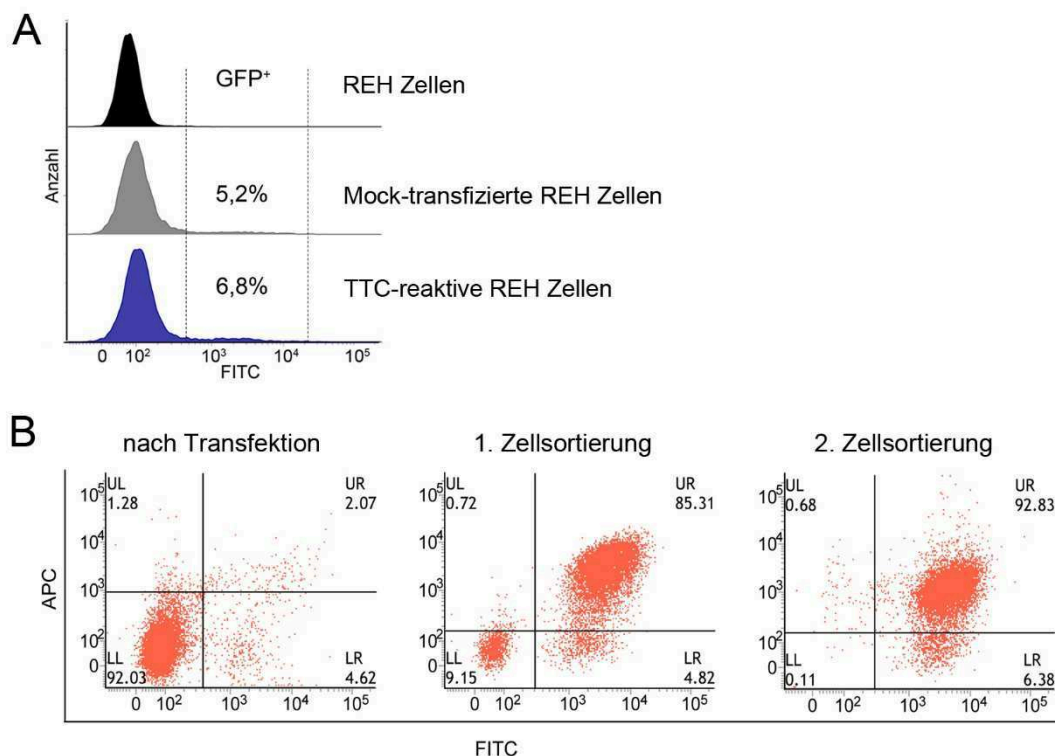


Abbildung 17: Transfektionseffizienz und Selektionsrunden positiv transfizierter REH-Zellen.

A) Die Transfektionseffizienz wurde zunächst über die Fluoreszenzintensität des Reporterproteins GFP im Durchflusszytometer (III.2.12) bestimmt. Dargestellt sind die Fluoreszenzintensitäten von nicht-transfizierten REH-Zellen (schwarz, oben), Mock-transfizierten REH-Zellen (Negativkontrolle, grau, Mitte) und TTC-reaktiven REH-Zellen (blau, unten).

B) Mit dem SNAP-TTC-BG-647 Protein (III.2.9) wurde die Präsenz des TTC-reaktiven IgG B-Zellrezeptors auf den REH-Zellen (III.2.5) nach der Transfektion (links) und nach zwei Selektionsrunden (Mitte & rechts, III.2.6) mittels Durchflusszytometrie detektiert (III.2.12).

Die Selektion TTC-reaktiver REH-Zellen erfolgte durch eine Sortierung (III.2.6) der SNAP-TTC-647⁺/GFP⁺ REH-Zellen. Durch mehrere Selektionsrunden auf SNAP-TTC-647⁺/GFP⁺ REH-Zellen wurden bis ~93% TTC-reaktive REH-Zellen angereichert (Abbildung 18B). Gleichzeitig wurde eine Mock-transfizierte Kontroll-REH Zellpopulation mit den Ausgangsvektoren pPB-AC10-LC/HC-EGFP (anti-CD30 Antikörper, III.1.8) generiert (Abbildung 18A). Beide REH-Zellpopulationen konnten für die *in vitro*-Charakterisierung der TTC-basierten Fusionsproteine verwendet werden.

Die Bestimmung der quantitativen B-Zellrezeptoranzahl (III.2.14) auf den TTC-reaktiven REH-Zellen wurde mittels der „Quantibrite^{PE} Beads“ (III.1.6) in durchflusszytometrischen Analysen (III.2.14)

Bindung an z.B. Integrin, α -Dystroglycan und Syndecan gefördert. Dabei sind die meisten Zellbindedomänen in den „G-like“ Domänen des Laminins der α 1-Kette lokalisiert [36, 37].

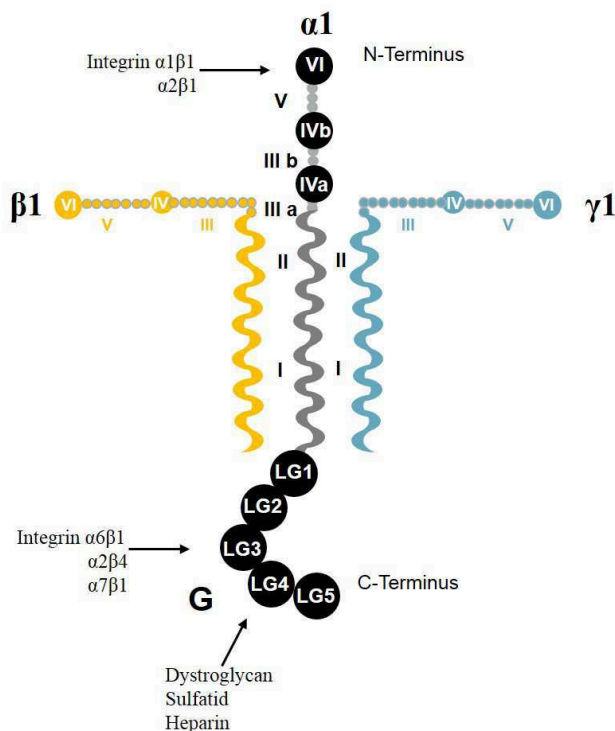


Abbildung 1: Schematische Struktur des extrazellulären Matrixproteins Laminin-1.

Das Glykoprotein Laminin-1 setzt sich aus den α 1, β 1 und γ 1-Ketten zusammen. Globuläre Domänen sind als Kreise und Bindungsstellen zur extrazellulären Matrix oder Zelloberflächenkomponenten sind mit Pfeilen dargestellt. Die α 1-Kette weist C-terminal Laminin G-like (LG) Domänen 1-5 auf. Die Abbildung wurde modifiziert nach [36-38].

Bei einer gesunden Nierenentwicklung wird das Laminin-1 durch das Laminin-11 ersetzt. Im Gegensatz dazu kommt es bei der LN zur Anhäufung von Laminin-1 in den subepithelialen und subendothelialen Bereichen und somit zur Entstehung von Antikörperablagerungen und Proteinurie [21, 22, 26]. In den glomerulären Endothelzellen und den Podozyten ist zusätzlich eine erhöhte Laminin-1 Expression nachgewiesen worden, sodass es zur Präsentation der Epitope der anti-Laminin-1 Autoantikörper kommt. Durch die Bindung der anti-Laminin-1 Autoantikörper an der glomerulären Basalmembran ist mit einer verstärkten Entzündungsreaktion zu rechnen, was eine mögliche Pathogenese-Relevanz des Laminin-1 als Autoantigen vermuten lässt. Identifikationsstudien autoreaktiver anti-Laminin-1 Antikörper beschränken sich auf α , β , γ Ketten des Laminins, ohne dass einzelne Bereiche auf exakte Epitope hin analysiert wurden [26, 39]. Nur die Arbeitsgruppe Naparstek (Universitätsklinikum Hadassah, Jerusalem, Israel) hat mit synthetischen Peptidsequenzen die Affinität von SLE-relevanten Laminin-1 Autoantikörpern gegenüber der Laminin α 1-Kette (LAMA1) untersucht [32, 40]. Hier konnte eine Peptidsequenz von 21 Aminosäuren, welche als VRT101 bezeichnet wurde, als Hauptepitop identifiziert werden. Die VRT101 Epitop Sequenz

Bindung an z.B. Integrin, α -Dystroglycan und Syndecan gefördert. Dabei sind die meisten Zellbindedomänen in den „G-like“ Domänen des Laminins der α 1-Kette lokalisiert [36, 37].

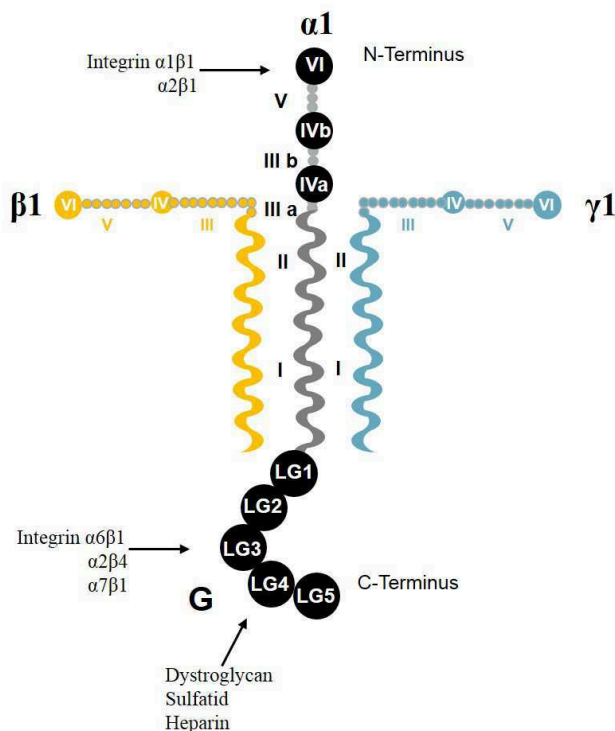


Abbildung 1: Schematische Struktur des extrazellulären Matrixproteins Laminin-1.

Das Glykoprotein Laminin-1 setzt sich aus den α 1, β 1 und γ 1-Ketten zusammen. Globuläre Domänen sind als Kreise und Bindungsstellen zur extrazellulären Matrix oder Zelloberflächenkomponenten sind mit Pfeilen dargestellt. Die α 1-Kette weist C-terminal Laminin G-like (LG) Domänen 1-5 auf. Die Abbildung wurde modifiziert nach [36-38].

Bei einer gesunden Nierenentwicklung wird das Laminin-1 durch das Laminin-11 ersetzt. Im Gegensatz dazu kommt es bei der LN zur Anhäufung von Laminin-1 in den subepithelialen und subendothelialen Bereichen und somit zur Entstehung von Antikörperablagerungen und Proteinurie [21, 22, 26]. In den glomerulären Endothelzellen und den Podozyten ist zusätzlich eine erhöhte Laminin-1 Expression nachgewiesen worden, sodass es zur Präsentation der Epitope der anti-Laminin-1 Autoantikörper kommt. Durch die Bindung der anti-Laminin-1 Autoantikörper an der glomerulären Basalmembran ist mit einer verstärkten Entzündungsreaktion zu rechnen, was eine mögliche Pathogenese-Relevanz des Laminin-1 als Autoantigen vermuten lässt. Identifikationsstudien autoreaktiver anti-Laminin-1 Antikörper beschränken sich auf α , β , γ Ketten des Laminins, ohne dass einzelne Bereiche auf exakte Epitope hin analysiert wurden [26, 39]. Nur die Arbeitsgruppe Naparstek (Universitätsklinikum Hadassah, Jerusalem, Israel) hat mit synthetischen Peptidsequenzen die Affinität von SLE-relevanten Laminin-1 Autoantikörpern gegenüber der Laminin α 1-Kette (LAMA1) untersucht [32, 40]. Hier konnte eine Peptidsequenz von 21 Aminosäuren, welche als VRT101 bezeichnet wurde, als Hauptepitop identifiziert werden. Die VRT101 Epitop Sequenz

Reporterproteins (GFP) zu dokumentieren zu können. Für die Analyse wurden die REH-Zellen mit je 1 µg des Proteins bei 4 °C bzw. 37 °C für 30 min inkubiert. Anschließend erfolgten die Aufnahmen der verschiedenen Inkubationsansätze über Konfokalmikroskopie (III.2.18). Die reduzierte Stoffwechselaktivität der REH-Zellen bei 4 °C ermöglicht den Nachweis der spezifischen Zellbindung des SNAP-TTC Proteins an TTC-reaktive B-Zellrezeptoren (Abbildung 20, 30 min/4 °C). Die erfolgreiche rezeptorvermittelte Endozytose und die Akkumulation des SNAP-TTC Proteins im Zytosol konnte innerhalb von 30 Minuten nach Zugabe des Proteins dokumentiert werden (Abbildung 20, 30 min/37 °C). Die Kontrollansätze weisen keine unspezifische Bindung des SNAP-TTC-BG-647 (III.2.9) Proteins auf (Abbildung 20).

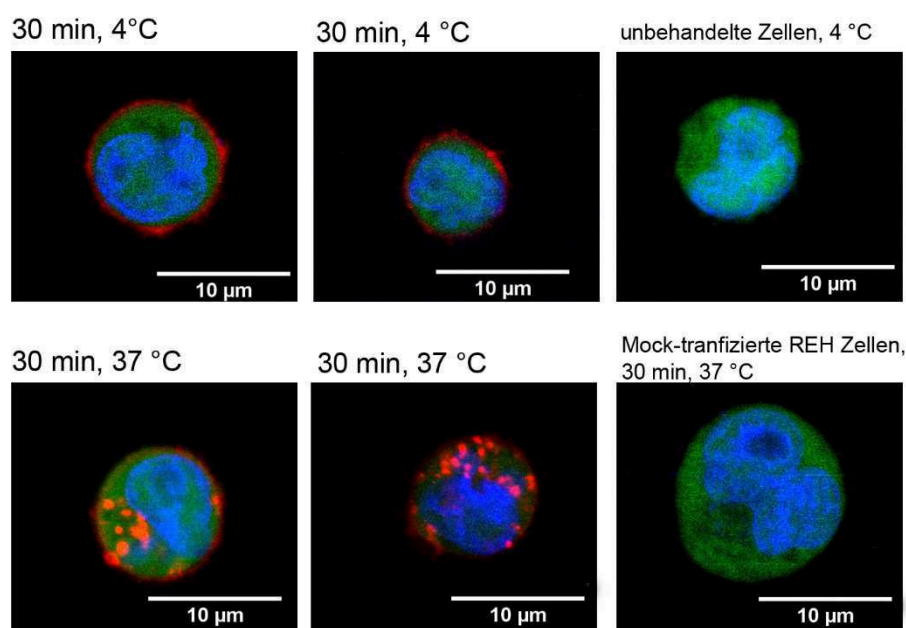


Abbildung 20: Internalisierungsanalyse der TTC-Proteine auf lymphozytischen TTC-reaktiven REH-Zellen.

Die angereicherte TTC-reaktive REH Zellpopulation (III.2.6) und die Mock-transfizierten REH Kontrollzellen (III.2.5) wurden jeweils mit 1 µg SNAP-TTC-BG-647 (rot, III.2.9) bei 4 °C bzw. 37 °C inkubiert. Der Zellkern wurde mit HOECHST 33342 gefärbt (blau) und die Aufnahme erfolgte mittels Konfokalmikroskopie (III.2.18). Der angegebene Maßstabsbalken entspricht 10 µm.

IV.2.3.3 Zytotoxizität der TTC-Fusionsprotein mit humanen Effektor-domänen auf TTC-reaktive REH-Zellen

In den XTT-Zellviabilitätsassays (III.2.15) wurde das zytotoxische Potenzial des aktivierten GrB(R201K)-TTC bzw. des TTC-MAPTau Proteins auf TTC-reaktiven humanen REH-Zellen im Vergleich zum Autoimmuntoxin TTC-ETA' untersucht. Sowohl die TTC-reaktiven REH-Zellen, als auch die Mock-transfizierten REH Kontrollzellen wurden mit einer seriellen Verdünnung der Proteine für 72 Stunden inkubiert. Für das TTC-ETA' Protein konnte eine konzentrationsabhängige Toxizität

auf den humanen REH-Zellen mit einer halbmaximalen effektiven Proteinkonzentration (EC_{50}) von $0,77 \pm 0,25$ nM ($\bar{x} \pm SEM$, $n=3$) ermittelt werden. Bei der Behandlung der TTC-reaktiven REH-Zellen mit dem Kontrollprotein TTC konnte kein toxischer Einfluss auf die Zellen durch die TTC-Zellbindedomäne detektiert werden (Abbildung 21A). Das TTC-ETA' Protein diente somit als Positivkontrolle für die Erreichbarkeit eines zytotoxischen Effekts.

Das aktivierte GrB(R201K)-TTC Protein vermindert die Vitalität der Zielzellen auf 45%, sodass ein EC_{50} Wert von $5 \pm 0,9$ nM ($\bar{x} \pm SEM$, $n=3$) berechnet werden konnte. Für das TTC-MAPTau Protein konnte eine um 20% reduzierte Zellvitalität der humanen TTC-reaktiven REH-Zellen dokumentiert werden (Abbildung 21). Da dieses Protein nicht die 50%ige Proliferationsinhibierung erreichte, konnte kein EC_{50} -Wert berechnet werden. Auf den Kontrollzellen zeigte keines der TTC-basierten Proteine einen toxischen Effekt (Abbildung 21B).

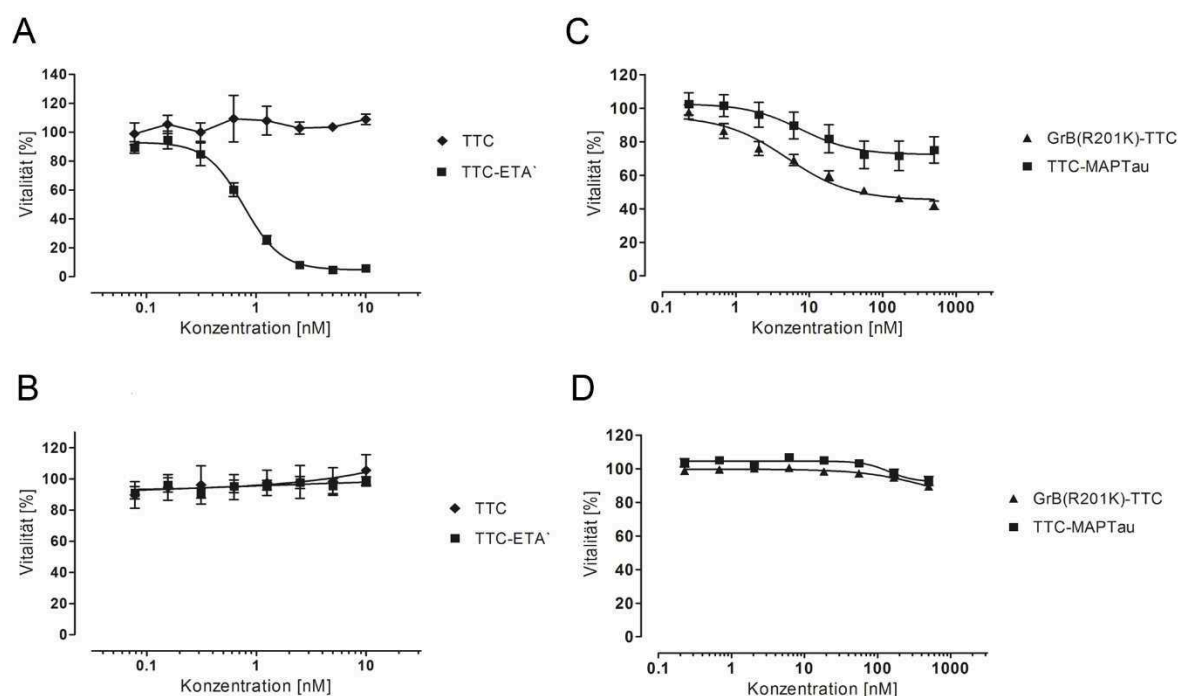


Abbildung 21: Zytotoxische Aktivität der TTC-Fusionsproteine auf humanen TTC-reaktiven REH-Zellen.

Die zytotoxische Aktivität der rekombinanten TTC-Fusionsproteine mit ETA' bzw. den humanen Effektordomänen (GrB-TTC, TTC-MAPTau III.2.8.2) wurde mithilfe von XTT-Zellviabilitätsassays (III.2.15) untersucht. Dabei wurden die TTC-reaktiven REH-Zellen, sowie die Mock-reaktiven Kontrollzellen (III.1.9) mit einer seriellen Verdünnung von TTC-ETA', TTC (A, B) und GrB(R201K)-TTC, TTC-MAPTau (C, D) für 72 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 50 µl XTT/Phenazine Methosulfat und für weitere 4 h inkubiert. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm und der Referenzwellenlänge 630 nm detektiert (III.2.15). Die halbmaximale effektive Proteinkonzentration (EC_{50}) wurde, bezogen auf unbehandelte Zellen (100% Proliferation) und Zeozin-behandelte Zellen (0% Proliferation), mit der „Fitting“-Methode „Sigmodal dose-response“ (variable slope) mit der GraphPad Prism Software berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte ($\bar{x} \pm SEM$) der Triplikate aus drei unabhängigen Experimenten ($n=3$).

Neben dem Nachweis der Proliferationsbeeinflussung nach Behandlung der TTC⁺ REH-Zellen mit den TTC-Fusionsproteinen wurde im nächsten Schritt die pro-apoptotische Aktivität dieser TTC-

Fusionsproteine analysiert. Mittels der AnnexinV/PI Färbung (III.2.16) wurde die pro-apoptotische Aktivität der GrB(R21K)-TTC bzw. TTC-MAPTau Proteine überprüft und die Anzahl der apoptotischen Zellen nach Behandlung bestimmt. Hierfür wurden die TTC-reaktiven REH-Zellen bzw. die Kontrollzellen mit jeweils 50 nM der Proteine für 72 h inkubiert und anschließend per AnnexinV/PI-Färbung im Durchflusszytometer analysiert (III.2.16). Exemplarisch sind die *dot plots* der Messungen auf TTC-reaktiven REH-Zellen dargestellt (Abbildung 22A). Im Vergleich zur Pufferkontrolle und den Kontrollproteinen TTC und Mock-ETA' konnte beim TTC-ETA' Protein eine statistisch signifikante Erhöhung der apoptotischen Zellen auf 75 % (Konfidenzintervall -94,43-35,42) detektiert werden. Für das GrB(R201K)-TTC Protein kann ebenfalls eine pro-apoptotische Aktivität mit einer statistisch signifikanten Erhöhung auf 42% apoptotischen Zellen (Konfidenzintervall 10,81-69,82) gegenüber dem GrB(R201K)-Mock Kontrollprotein nachgewiesen werden (Abbildung 22A). Im Gegensatz dazu konnte für das TTC-MAPTau Protein keine signifikante pro-apoptotische Aktivität auf TTC-reaktive REH-Zellen ermittelt werden. Die TTC-Fusionsproteine weisen keine unspezifische Toxizität auf den Mock-transfizierten REH-Zellen auf (Abbildung 22B).

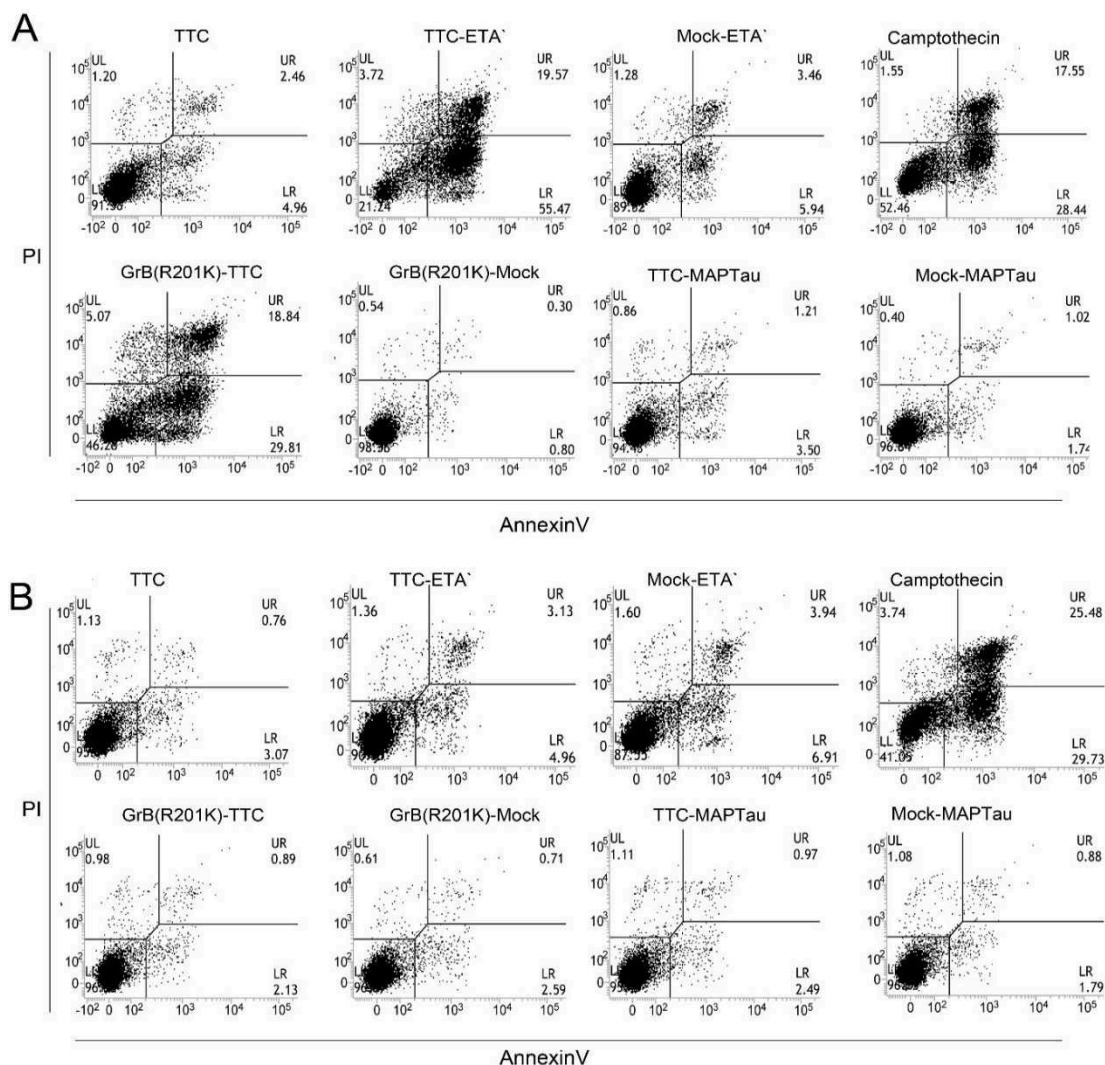


Abbildung 22: Bestimmung der proapoptotischen Aktivität TTC-basierter Fusionsproteine mittels AnnexinV/PI-Färbung.

Nach 72 h Inkubation der Zellen mit den Fusionsproteinen wurde die proapoptotische Aktivität mittels AnnexinV/PI Färbung im Durchflusszytometer (III.2.16) bestimmt. Repräsentativ sind die *dot plots* für jedes Fusionsprotein auf TTC-reaktiven REH-Zellen (A) und Mock-transfizierter REH-Zellen (B) dargestellt, wobei die einzelnen Quadranten den prozentualen Anteil der Zellpopulation in den Stadien angibt (unten links: lebende Zellen, unten rechts: früh apoptotische Zellen, oben rechts: spät apoptotische/nekrotische Zellen). Neben den TTC-Proteinen wurden Kontrollproteine entsprechen der verwendeten Effektordomänen (Mock-ETA', GrB-Mock und Mock-MAPTau, III.2.12) als Negativkontrolle und Camptothecin als Positivkontrolle verwendet.

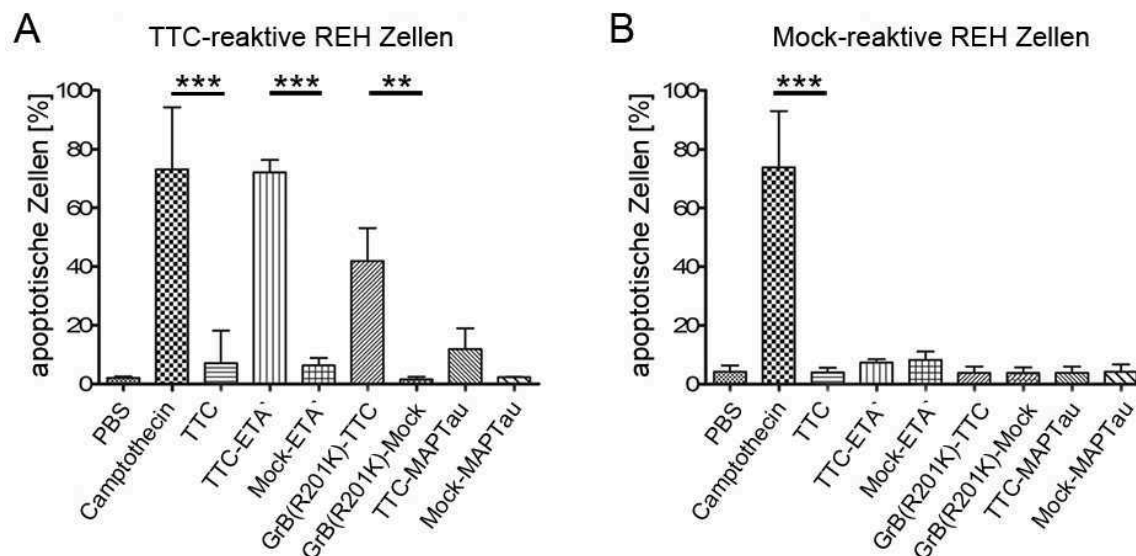


Abbildung 23: Prozentualer Anteil apoptotischer REH-Zellen nach Behandlung mit TTC-Fusionsproteinen.

Nach 72 h Inkubation der Zellen mit den TTC-basierten Fusionsproteinen (TTC, TTC-ETA', GrB201K-TTC, MAPTau-TTC) und den Kontrollproteinen (Mock-ETA', GrB201K-Mock und Mock-MAPTau) wurde die proapoptotische Aktivität mittels AnnexinV/PI-Färbung im Durchflusszytometer (III.2.16) bei TTC-reaktiven REH Zellen (A) und Mock-reaktiven REH Zellen (B) bestimmt. Als Pufferkontrolle wurde PBS und als Apoptose-induzierende Kontrolle wurde Camptothecin verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) der Duplikate aus drei unabhängigen Experimenten (n=3). Die statistische Signifikanz wurde mithilfe des *one-way ANOVA* gefolgt von einem Bonferroni Posthoc Test ermittelt (** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

IV.3 Herstellung Autoantigen-basierter zytotoxischer Fusionsproteine

Der modulare Charakter der zytotoxischen Fusionsproteine ermöglichte es sowohl die Zielzell-spezifische Bindungsdomäne als auch die Effektordomäne auszuwechseln. Im Rahmen des dritten Teils dieser Arbeit wurde daher das Modellantigen TTC durch ein Autoantigen mit krankheitsbezogener Relevanz bei SLE-Patienten ausgetauscht. Die resultierenden Fusionsproteine mit bakteriellen bzw. humanen Effektordomänen wurden mit den bereits beschriebenen Methoden hergestellt und auf ihre Wirksamkeit hin untersucht.

IV.3.1 Identifikation eines SLE-spezifischen Autoantigens

Bereits seit 20 Jahren wird nach Biomarkern für die unterschiedlichen Krankheitsphasen (vor, während und nach dem Krankheitsschub) des SLE gesucht. Die Identifikation von SLE-spezifischen

Autoantigen ist daher immer noch aktuell zur Weiterentwicklung neuer Therapieansätze. In diesem Zusammenhang wurde ausgehend von beschriebenen Studien zum krankheitsrelevanten Autoantigen, der Laminin α 1-Kette [32, 40], dieses Autoantigen als Zellbindungsdomäne für die Generierung therapeutisch wirksamer Fusionsproteine ausgewählt. Zur Identifikation möglicher Epitopbereiche und zur Vereinfachung des Herstellungsprozesses wurden kleinere Abschnitte der Laminin α 1-Kette als potentielle Zellbindungsdomäne verwendet. Der Fokus lag hier auf dem bereits beschriebenen Epitopbereich, dem sogenannten VRT101 Peptid [32]. VRT101 liegt im Aminosäurebereich 2905-2925 der α 1-Kette und somit in der globulären Laminindomäne (LG) 5 (Abbildung 24). Die ausgewählten potentiellen Zellbindungsdomänen V1 bis V4 enthielten diese Peptidsequenz; die Varianten V1 und V2 N-terminal, die Varianten V3 und V4 C-terminal. Im Gegensatz zu den kurzen Proteinvarianten V1 bis V3, umfasst die Variante V4 312 Aminosäuren und beginnt im Bereich der globulären Laminindomäne 3 und geht über die LG 4 bis zur LG 5 (Abbildung 24).

Zusätzlich zum VRT101 Sequenzbereiches wurde der Abschnitt AS 2613-2746 in der Variante V6 ausgewählt, welcher in den Domänen LG 3 und LG 4. Weiterhin wurde die gesamte globuläre Laminindomäne 5 ebenfalls als Zellbindungsdomäne für die Generierung der Fusionsproteine verwendet, um zu untersuchen, ob die anti-Laminin Autoantikörper neben den bekannten linearen Epitop (VRT101) auch Konformationsepitope auf dem Autoantigen erkennen.

Für die Identifikation der Laminin α 1-Kette als potenzielles SLE-spezifisches Autoantigens wurden von den oben beschrieben Varianten sowohl humane als auch murine Konstrukte generiert. Die humanen Laminin Proteinvarianten wurden herbei für erste Untersuchungen Seren und Urinproben von SLE-Patienten verwendet. Die murinen Konstrukte wurden für *in vitro*-Studien auf murinen Laminin-reaktiven Hybridomzellen und für erste Analysen mit dem Mausmodell K14-CD40L tg herangezogen.

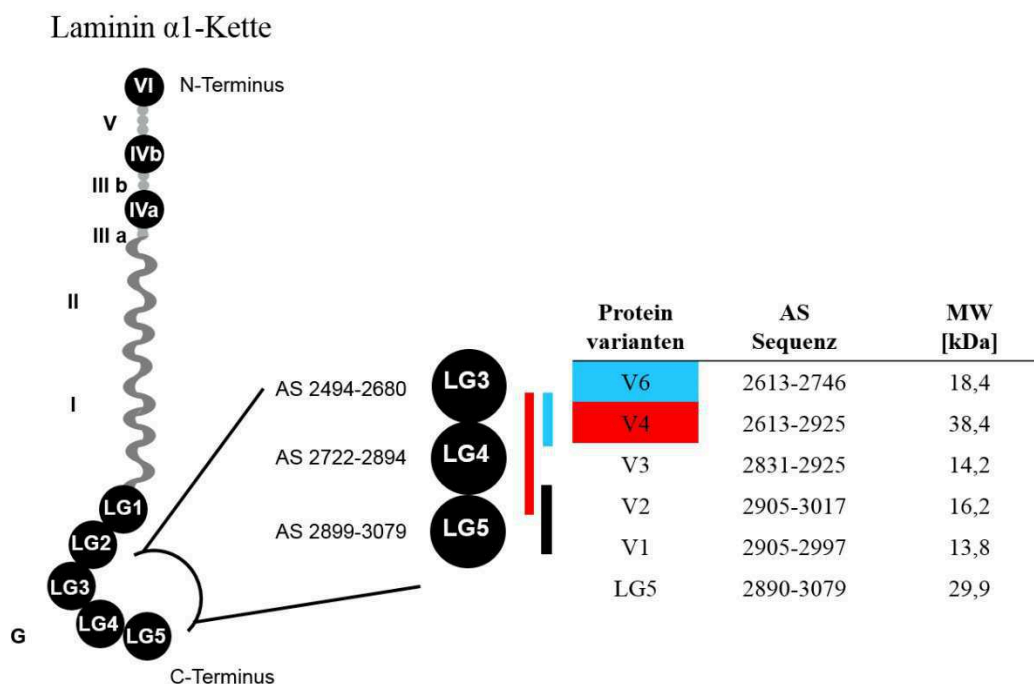


Abbildung 24: Schematische Darstellung der humanen Laminin α 1-Kette und der in dieser Studie verwendeten potentiellen Zellbindungsdomänen.

Ausgehend vom beschriebenen Autoantikörper-Epitop VRT101 (AS 2905-2925 [40]) wurden verschiedene Varianten generiert, die sich innerhalb der C-terminalen LG-Domänen 3 bis 5 auf der α 1-Kette des Laminin 1 befinden. Für die verschiedenen Varianten sind Aminosäure-Sequenzbereiche (AS) innerhalb der Laminin α 1-Kette und das entsprechende theoretische Molekulargewicht (MW) angegeben. Illustration abgewandelt nach [37].

IV.3.2 Herstellung und *in vitro*-Charakterisierung von humanen Laminin α 1-basierten Fusionsproteinen

Die ausgewählten Proteinlängenvarianten V1-6, sowie die C-terminale LG 5 Domäne wurden mittels spezifischer Primer (III.1.8), welche die Restriktionsschnittstellen *Sfi*I und *Not*I für die Klonierung in die pBM- bzw. pMS-Vektoren (III.1.8) enthielten, mittels PCR (III.2.1.3) vom synthetischen cDNA Klon (III.1.8) des humanen LAMa1 amplifiziert. Die Expression der kurzen LAMa1-Proteinvarianten V1/V2 konnte weder im prokaryotischen (*E. coli* Rosetta™ 2 DE3, III.2.8.1) als noch im eukaryotischen (HEK 293T Zellen, III.2.4) Expressionssystem dargestellt werden. Wurde das humane LAMa1-V2 als Fusionsprotein mit ETA' in die *E. coli* Rosetta™ 2 DE3 transformiert, konnte es unter osmotischen Stressbedingungen exprimiert (III.2.8.1) und nach Aufschluss der *E. coli* Zellen über IMAC (III.2.8.2) gereinigt werden (Abbildung 25). Im Gegensatz zu den humanen LAMa1-Varianten V1 und V2 konnte die LAMa1-V3 Proteinvariante in *E. coli* Rosetta™ 2 DE3 mit einer Ausbeute von 153 mg/l Bakterienkultur hergestellt und über IMAC gereinigt werden (Abbildung 25). Die humanen LAMa1-V4 und G5 Proteinvarianten konnten in *E. coli* Rosetta™ 2 DE3 produziert (III.2.8.1) und über IMAC (III.2.8.2) gereinigt werden (Abbildung 25). Die transfizierten HEK 293T Zellen (III.2.4) haben das Fusionsproteins SNAP-hLAMa1-G5 und die hLAMa1-V6 Proteinvariante nicht exprimiert.

Zusammenfassend sind in der Tabelle 13 die Expressionssysteme und die ersten *in vitro*-Analysen der humanen LAMa1-Proteinvarianten aufgelistet.

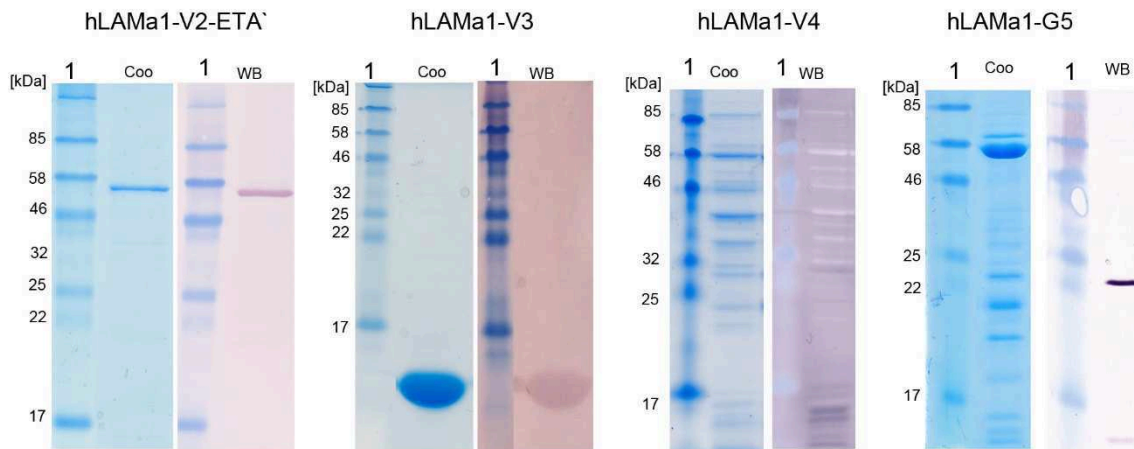


Abbildung 25: Proteinreinigung der rekombinanten humanen LAMa1-Proteinvarianten.

Detektion der rekombinanten hLAMa1-Proteine nach IMAC Reinigung (III.2.8.2). Die humanen LAMa1-Fusionsproteine wurde über SDS-PAGE und „Coomassie-Brilliant-Blue“ Färbung (III.2.8.3) visualisiert (Coo, 1 - Color Prestained Protein Standard, III.1.2). Im Western Blot (WB, III.2.8.4) wurden mithilfe der α -His-/G α M^{AP} Antikörper (III.1.6) die hLAMa1-Fusionsproteine nachgewiesen (1 - Color Prestained Protein Standard, III.1.2). Es wurden folgende Proteinegrößen hLAMa1-V2-ETA' - 55,5 kDa; hLAMa1-V3 - 14,2 kDa; hLAMa1-V4 - 38,4 kDa; hLAMa1-G5 - 29,9 kDa erwartet.

Um erste *in vitro*-Analysen mit den rekombinanten humanen Proteinvarianten durchführen zu können, wurden die murinen DNA/Laminin-reaktiven C72 Antikörpers bzw. des Laminin-reaktiven AK8 Antikörper der Hybridomzellen (III.1.9) auf eine mögliche Antikörper-Antigen-Bindung untersucht. Hiefür erfolgte eine SDS-PAGE (III.2.8.3) mit anschließender Western Blot-Analyse (III.2.8.4), bei der die Hybridom-Überstände der C72/AK8 Hybridome (III.1.9) verwendet wurden. In Abbildung 29 ist die WB-Analyse der murinen C72 / AK8 Antikörper an das rekombinante hLAMa1-V3 Protein im Vergleich zum α -His AK (III.1.6) dargestellt. Die Antikörper C72/AK8 binden an das hLAMa1-V3 Protein (14,2 kDa), wobei der C72 Antikörper auch an die Negativkontrolle, das TTC Protein (55 kDa) bindet und somit eine unspezifische Bindung aufweist. Im nächsten Schritt wurde das Bindungsverhalten der C72/AK8 Antikörper anhand von ELISA Studien (III.2.19, Variante D) getestet. Dabei wurden ELISA-Platten zunächst mit dem rekombinanten hLAMa1-V3 Protein beschichtet und mit einer seriellen Verdünnung der Hybridomüberstände das Bindungsverhalten der C72/AK8 Antikörper untersucht (Abbildung 30A und B). Hier konnte eine Bindung des C72 Antikörpers an das hLAMa1-V3 Protein, jedoch auch eine deutliche unspezifische Bindung des C72 Proteins an das Kontrollprotein TTC detektiert werden (Abbildung 30A). Der AK8 Antikörper bindet nicht an das hLAMa1-V3 Protein (Abbildung 30B). Bei weiteren ELISA Untersuchungen wurde die Bindungsaktivität dieser anti-Laminin Antikörper (C72/ AK8) auf denaturiertem hLAMa1-V3 Protein

(KEGYKVQSDVNITLERTSSQ) befindet sich innerhalb der LG5 Domäne der Laminin α 1-Kette (Abbildung 1). Sowohl Autoantikörper aus SLE-Patienten Seren als auch Autoantikörper in Mausmodellen mit SLE-ähnlichen Symptomen erkannten in dieser Studie diese Peptidsequenz und der Antikörpertiter korrelierte stark mit der Krankheitsausprägung [32, 40]. Im nächsten Schritt wurde das VRT101-Peptid an eine Sephadrose Matrix gekoppelt und als Affinitätsäule verwendet. Dabei konnte eine effiziente Reduzierung von anti-VRT101 Antikörper aus dem Serum von SLE-Patienten nachgewiesen werden, sodass die Entwicklung einer Plasmapherese mit Laminin-gekoppelten Matrixmaterial vorgeschlagen wurde [32, 40].

Ein Mausmodell, welches die Untersuchung autoreaktiver Laminin-Antikörper erlaubt, ist das transgene K14-CD40L Modell. Bei diesen transgenen Tieren wird der CD40-Ligand (CD40L) unter der Kontrolle des Keratin-14 Promoters in der Epidermis überexprimiert [41]. Dies führt zu einer kontinuierlichen Aktivierung von epidermalen antigen-präsentierenden Zellen (dendritischen Zellen), zur Differenzierung pathogener Effektor-T-Zellen und somit zum Zusammenbruch der Selbsttoleranz [41]. Diese Mäuse bilden ab einem Alter von 2-3 Monaten SLE-ähnliche Symptome aus, zu denen das Auftreten von hohen Autoantikörperkonzentrationen, das Vorhandensein von CD8⁺ T-Zellen und aktivierten B-Zellen, sowie die Ausbildung einer Glomerulonephritis mit Proteinurie gehören. Weiterhin tritt eine Dermatitis an Schnauze und Ohren auf [42, 43]. Dieses Mausmodell bietet gegen über humanen Studien den Vorteil Entstehung und Lokalisierung bzw. Akkumulierung der anti-Laminin Antikörper in den unterschiedlichen Geweben (Lymphknoten, Milz, Haut, Nieren) und zu den verschiedenen Zeitpunkten (vor, während und nach Krankheitsausbruch) untersuchen zu können. Jedoch kann nicht unmittelbar bei guten Erfolgen im Mausmodell auf vergleichbare Erfolge bei der Anwendung am Menschen geschlossen werden, da die Ausbildung und der Krankheitsverlauf des SLE sehr heterogen beim Menschen auftritt und somit ein transgenes Mausmodell nur einen Teil der im Patienten vorhandenen pathogenen Faktoren widerspiegelt. Mit Mausmodellen können jedoch erste Wirksamkeitsstudien von neu-entwickelten therapeutischen Ansätzen im Gesamtorganismus durchgeführt werden. Sie dienen zum anderen auch zur Bestimmung von maximalen Dosis potentieller neuer Therapeutika [44].

I.2 Eigenschaften autoreaktiver B-Lymphozyten

B-Lymphozyten regulieren die Immunantwort und Entwicklung des Immunsystems. Hierbei, sind die B-Zellen nicht nur für die Produktion von Antikörpern (natürliche, adaptive oder auto) verantwortlich, sondern nehmen über die Zytokinproduktion Einfluss auf Modifikationen (Aktivierung/Differenzierung) der T- und dendritischen Zellen [45, 46]. Im Falle einer Autoimmunerkrankung entsteht eine positive Feedback Schleife innerhalb der Toleranzkontrollpunkte während der B-Zellreifung, sodass unerwünschte autoreaktive B-Zellen nicht entfernt werden. Diese defekten Toleranzpunkte sind durch abnormale klonale Deletion und fehlerhaftes Rezeptorediting gekennzeichnet, sodass z.B. bei SLE-Patienten eine erhöhte Anzahl autoreaktiver Vorläufer B-Zellen

Seren (**A**, Verdünnung 1:1000) und Urinproben (**B**, Verdünnung 1:100) von SLE-Patienten mit aktiver Nephritis (NS), Nephritis in Remission (NR), aktiver Erkrankung ohne Nierenbeteiligung (S) und gesunden Kontrollen (G) wurden mittels ELISA (III.2.19, Variante A) auf anti-LAMa1-Antikörper getestet. Die ELISA-Platten wurden mit 5 µg/ml LAMa1-Peptid (AS 2613–2746) beschichtet und die Bindung der Autoantikörper mittels Ziege anti-human IgG-HRPO Antikörper und ABTS Substrate (ELISA Variante A III.2.19) durchgeführt. Die statistische Signifikanz wurde mithilfe des Kruskal-Wallis Tests und des Dunn's Multiple Comparison Tests berechnet (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001). Die Experimente wurden vom Projektpartner am Uniklinikum Münster, Sektion Rheumatologie und Klinische Immunologie Innere Medizin D unter Leitung von Prof. Annett Jacobi durchgeführt und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Zusammenfassend konnte aufgrund der nur geringen Produktionsraten humaner Lamininproteinvarianten lediglich erste *in vitro*-Analysen hinsichtlich der Autoantikörper-Antigen-Erkennung durchgeführt werden (Tabelle 13). Die murinen Laminin-reaktiven Hybridomzellen (C72, AK8, III.1.9) sind nicht für die *in vitro*-Charakterisierung der rekombinanten humanen Lamininproteine geeignet. Trotzdem konnten anhand der ELISA Analysen mit dem kommerziellen Protein neue Erkenntnisse gewonnen werden. Der AS Bereich 2613-2746 in der LG3-4 Domäne beinhaltet ein Epitop für anti-Laminin Autoantikörper.

Tabelle 13: Übersicht rekombinanter Laminin Proteinvarianten

* murines LAMa1-Peptid (AS 2640-2773; Antibody online GmbH), # - unspezifische Bindung, Abkürzungen: AS – Aminosäure, DZ – Durchflusszytometrie, SLE – Systemischer Lupus erythematodes

Laminin α 1 Protein- varianten	AS Sequenz	Funktionelle Domäne	MW [kDa]	Expressionssystem	Expressions- ausbeute [mg/l]	Bindung C72 / AK8 Antikörper - ELISA	Bindung an C72 / AK8 Hybridomzellen - DZ	Auto- antikörper Reaktion SLE Patienten
V1	2905-2997		13,8	<i>E. coli</i> Rosetta 2 DE3 / HEK 293T	-			
V2	2905-3017		16,2	<i>E. coli</i> Rosetta 2 DE3 / HEK 293T	-			
V2		ETA'	55,5	<i>E. coli</i> Rosetta 2 DE3	0,4		nein	
V3	2831-2925		14,2	<i>E. coli</i> Rosetta 2 DE3	153,0	ja [#] / ja	nein	nein
V4	2613-2925		38,4	<i>E. coli</i> Rosetta 2 DE3	0,3		nein	
G5	2890-3070		29,9	<i>E. coli</i> Rosetta 2 DE3	0,4		nein	
G5		SNAP	50,1	HEK 293T	-			
V6	2613-2746		18,4	HEK 293T	-			
Kommerziell *	2613-2746			<i>E. coli</i>				ja

IV.3.3 Herstellung und *in vitro*-Charakterisierung muriner Laminin α 1-basierten Fusionsproteine

Für die präklinische Entwicklung von therapeutischen Ansätzen ist die Verwendung von Mausmodellen ein notwendiger Zwischenschritt, um die spezifische Zellbindung und die Wirksamkeit der neuen Fusionsproteine zu untersuchen. Um diesen Schritt vorzubereiten, wurden die in IV.3.1 beschriebenen Laminin-Varianten auch anhand der murinen Laminin α 1-Kette und somit murine Konstrukte hergestellt. Weiterhin sollte anschließend untersucht werden, ob das beschriebene K14-CD40L tg Mausmodell nach Krankheitsausbruch anti-Laminin-Autoantikörper aufweist und somit als Modell für angehende Wirksamkeitsstudien in Frage kommt.

Die Generierung der murinen LAMa1-Proteinvarianten V4, V6 sowie der G5-Domäne erfolgte analog zur Herstellung der humanen Konstrukte über die Amplifikation des synthetischen cDNA-Klons (III.1.8) mittels spezifischer Primer (inklusive der Restriktionsschnittstellen *Sfi*I und *Not*I, III.1.8) und anschließender Klonierung in die pBM- bzw. pMS- Expressionsvektoren (III.1.8). Sowohl die Proteine ohne Fusionspartner als auch die Fusionsproteine mit den verschiedenen funktionellen Domänen (SNAP, ETA') konnten erfolgreich exprimiert und gereinigt werden (Abbildung 27). Die entsprechend verwendeten Expressionssysteme und die Proteinausbeuten sind in der Tabelle 14 zusammengefasst. Das Fusionsprotein mLAMa1-V6-SNAP konnte mit den transfizierten HEK 293T Zellen trotz positiver Transfektion, Produktion des Markerproteins eGFP, nicht in löslicher Form aus dem Zellkulturüberstand gereinigt werden. Eine Western Blot Analyse mit positiv transfizierten HEK 293T Zellen zeigte die Expression des mLAMa1-V6 Proteins in den HEK 293T Zellen. Hierbei wurden grün-fluoreszierende HEK 293T Zellen geerntet mit PBS gewaschen und mit einer Trypsin-Lösung (Tryple Express, Thermo Scientific Fisher) für 10 min bei 37 °C inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (4000 xg, 10 min) der Zellen erfolgte die Auftrennung der Protein aus dem resultierendem Überstand und dem Zellpellet mittels SDS-PAGE (III.2.8.3) und anschließender Detektion mithilfe der α -His/G α MAP Antikörper (III.1.6) in der Western Blot Analyse (III.2.8.4). Das mLAMa1-V6-SNAP Fusionsprotein (41,1 kDa) konnte zu einem geringen Anteil in dem trypsinierten Überstand der transfizierten HEK 293T Zellen (Abbildung 28, Reihe 2 +3) und hauptsächlich im Zellpellet (Abbildung 28, Reihe 4 + 5) nachgewiesen werden.

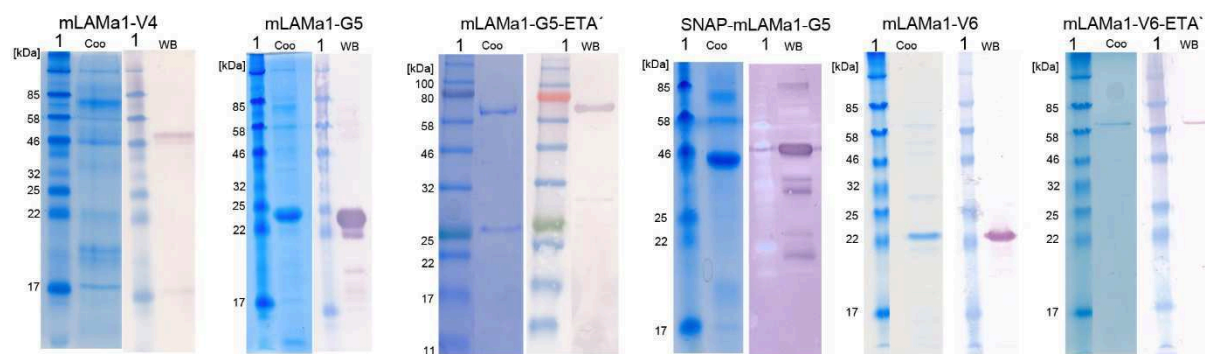


Abbildung 27: SDS-PAGE und Western Blot der rekombinanten murinen LAMa1 Fusionsproteine.

Detektion der rekombinanten mLAMa1 Proteine nach IMAC Reinigung (III.2.8.2). Die Fusionsproteine wurde über SDS-PAGE und „Coomassie-Brilliant-Blue“ Färbung (III.2.8.3) des Acrylamidgels visualisiert (Coo, 1 - Color Prestained Protein Standard, III.1.2). Im Western Blot (WB, III.2.8.4) wurden mithilfe der α -His/G α M^{AP} Antikörper (III.1.6) die mLAMa1-Fusionsproteine nachgewiesen (1 - Color Prestained Protein Standard, III.1.2). Es wurden folgende Proteingrößen mLAMa1-V4 (47,2 kDa), mLAMa1-G5 (23,1 kDa), mLMAa1-G5-ETA' (59,9 kDa), SNAP-mLAMa1-G5 (44,3 kDa), mLAMa1-V6 (18,7 kDa) und mLAMa1-V6-ETA' (58,1 kDa) erwartet.

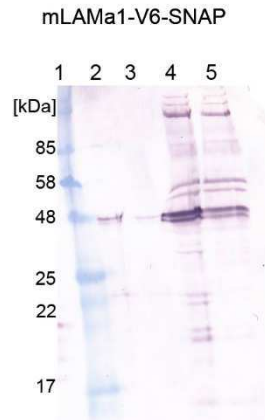


Abbildung 28: Western Blot des SNAP-mLAMA1-V6 in den HEK 293T Zellen.

Es erfolgte die Detektion des rekombinanten mLAMA1-V6-SNAP Fusionsproteins in den transfizierten HEK 293T Zellen mittels Western Blot Analyse (III.2.8.4). Transfizierte grün-fluoreszierende HEK 293T Zellen (III.2.4) wurden geerntet, mit PBS gewaschen und mit Trypsin für 10 min inkubiert. Nach Zentrifugation (4000x g, 10 min) wurden die Proteine in dem resultierenden Überstand und aus dem Zellpellet mittels SDS-PAGE (III.2.8.3) aufgetrennt und mithilfe der α -His/G α M^{AP} Antikörper (III.1.6) nachgewiesen. Dargestellt sind in Reihe 1: NEB Proteinmarker (III.1.2), Reihe 2 + 3: trypsiniertes Überstand, Reihe 4 + 5: Zellpellet. Das mLAMA1-V6-SNAP Fusionsprotein wurde bei einer Proteingröße von 41,1 kDa erwartet.

Die gereinigten rekombinanten Proteinvarianten mLAMA1-G5 (23,1 kDa), mLAMA1-V4 (47,2 kDa) und mLAMA1-V6-ETA' (58,1 kDa) wurden für die Bindungsanalyse der Laminin-reaktiven Antikörper C72 und AK8 (III.1.9) im Vergleich zum Kontrollprotein TTC verwendet. Im Western Blot (III.2.8.4) konnte eine schwache Bindung des C72-Antikörpers aus den Zellkulturüberständen der Hybridomzellen an den murinen Proteinvarianten detektiert werden (Abbildung 29). Dabei ist auch eine unspezifische Bindung des DNA/Laminin-reaktiven Antikörpers C72 an Teilfragmente des mLAMA1-V4 Proteins und an der Negativkontrolle, dem TTC Protein (55 kDa) nachweisbar. Der Laminin-reaktive Antikörper AK8 zeigt eine Bindung auf murinen Proteinvarianten im Western Blot, jedoch keine unspezifische Bindung an das TTC-Protein (Abbildung 29).

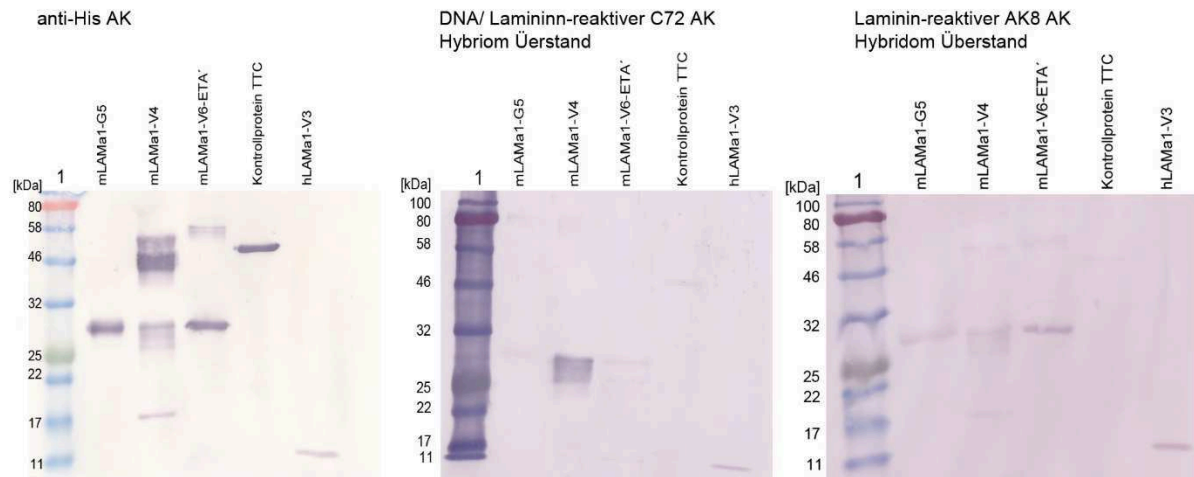


Abbildung 29: Western Blot-Analyse muriner/humaner rekombinanter LAMA1-Proteine mit Laminin-reaktiven Hybridomüberständen.

Je 1 µg rekombinantes mLAMA1-G5, mLAMA1-V4, mLAMA1-V6-ETA', hLAMA1-V3 und Kontrollprotein TTC (III.2.8.2) wurde für die Western Blot Analyse verwendet und mit α -His AK (III.1.6), DNA/Laminin-reaktiver C72 Hybridom-Überstand und Laminin-reaktiver AK8 Hybridom-Überstand (III.1.9) und sekundärem Antikörper $\text{G}\alpha\text{M}^{\text{AP}}$ bzw. $\text{G}\alpha\text{M}2^{\text{AP}}$ (III.1.6) nachgewiesen (1 - Color Prestained Protein Standard, III.1.2). Es wurden folgende Proteinegrößen mLAMA1-G5 (23,1 kDa), mLAMA1-V4 (47,2 kDa), mLAMA1-V6-ETA' (58,1 kDa), hLAMA1-V3 (14,8 kDa) und TTC (55 kDa) erwartet.

Weiterhin wurde die Bindungsaktivität des Antikörpers C72/AK8 im ELISA (III.2.19, Variante D) untersucht. Dabei wurden die ELISA-Platten mit den rekombinanten nativen mLAMA1-Proteinvarianten mLAMA1-G5, mLAMA1-V4 und mLAMA1-V6-ETA' sowie dem Kontrollprotein TTC beschichtet und das Bindungsverhalten des C72/AK8 Antikörpers durch eine serielle Verdünnung der Hybridomüberstände (III.1.9) nachgewiesen. Hierbei konnte eine Bindung des C72-Antikörpers an mLAMA1-V6-ETA' und mLAMA1-G5 nachgewiesen werden, jedoch wurde ein höheres Signal bei der unspezifischen Bindung des C72-Antikörpers an das Kontrollprotein TTC detektiert (Abbildung 30A). Im Gegensatz dazu konnte keine Bindung des AK8-Antikörpers an den murinen Laminin-Proteinvarianten im ELISA ermittelt werden (Abbildung 30B). Bei weiteren ELISA Untersuchungen wurde die Bindungsaktivität dieser anti-Laminin Antikörper (C72/ AK8) auf den denaturiertem Proteinen getestet. Hierfür wurde die ELISA Platten mit dem rekombinanten Protein über Nacht bei 4 °C beschichtet und anschließend mit einer 3 M Urealösung (Endkonzentration) für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert, wie von Hnasko *et al.* (2011) [140] beschrieben. Es folgten die weiteren Schritte zum Blocking, Inkubation der Hybridomüberstände und Detektion der Antikörper wie in III.2.19 Variante D beschrieben. Es konnte eine Bindung des C72 Antikörper an das denaturierte mLAMA1-V6-ETA' Protein detektiert werden (Abbildung 30C). Jedoch ist wie bei den ELISA Analysen mit den nativen Proteinen ein stärkeres Signal hinsichtlich der Bindung des C72 Antikörper ans denaturierte Kontrollprotein TTC nachgewiesen worden (Abbildung 30C). Der IgM AK8 Antikörper weist kein Bindungsverhalten gegenüber den denaturierten Proteinen auf (Abbildung 30D).

vorliegt [47]. Die autoreaktiven B-Lymphozyten unterscheiden sich von den normalen B-Lymphozyten durch folgende Eigenschaften: 1) Sekretion von Autoantikörpern, 2) Präsentation von Autoantigenen, 3) Sekretion von entzündungsfördernden Zytokinen und Chemokinen (Interleukin (IL)-6, Interferon gamma (IFN- γ), IL-4 und Tumor-Nekrose Faktor beta (TNF- β) und damit die Beeinflussung von dendritischen Zellen, Makrophagen und regulatorischen T-Zellen, 4) Modulation der Antigen-Prozessierung und Präsentation (Abbildung 2) [6, 45, 48, 49].

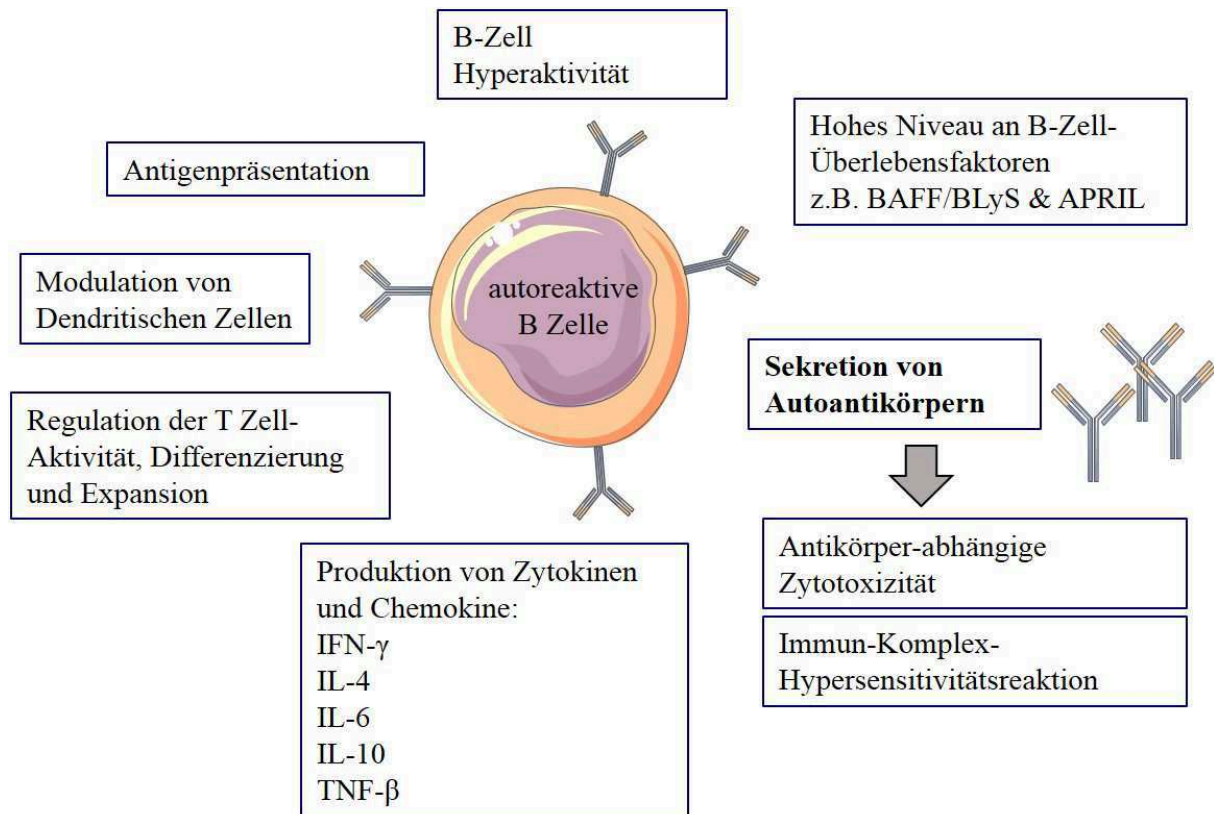


Abbildung 2: Übersicht zur Rolle autoreaktiver B-Lymphozyten.

Neben der Sekretion von Autoantikörpern und der damit verbundenen Antikörper-abhängigen Zytotoxizität sowie der Immunkomplex-Hypersensitivitätsreaktionen haben autoreaktive B-Zellen noch weitere biologische Funktionen. Dazu zählt die Antigen-Präsentation, wodurch die Modulation der Aktivität dendritischer Zellen und die Regulation der Aktivität, Differenzierung und Expansion von T-Zellen beeinflusst werden. Abkürzungen: APRIL- „a proliferation-inducing ligand“, B-Zellüberlebensfaktor; BLyS – B-Zellüberlebensfaktor; IFN – Interferon; IL – Interleukin; TNF – Tumornekrosefaktor.

Die Abbildung wurde modifiziert nach [14, 48].

Über die Antikörper-abhängige Funktion beeinflussen die Autoantikörper Rezeptorfunktionen, wie Aktivierung und Inhibierung, und unterstützen die Antigen-Aufnahme von Antigen-präsentierenden Zellen. Dabei werden die Antigen-Antikörper-Komplexe über den konstanten Bereich des Fc-Rezeptors der Makrophagen und der dendritischen Zellen aufgenommen [6].

Bei SLE-Patienten treten im Vergleich zu gesunden Menschen Verschiebungen der peripheren B-Zell-Subpopulationen auf. So finden sich z.B. eine erhöhte Frequenz transistionaler und CD38⁺-prä-germinal B-Zellen, CD27⁺IgD⁻ Gedächtnis-B-Zellen und CD27^{high} Plasmablasten im peripheren Blut [50]. Die CD27⁺IgD⁻ B-Zellen exprimieren dabei nur in geringer Anzahl den inhibitorischen Fc γ RIIB

vorliegt [47]. Die autoreaktiven B-Lymphozyten unterscheiden sich von den normalen B-Lymphozyten durch folgende Eigenschaften: 1) Sekretion von Autoantikörpern, 2) Präsentation von Autoantigenen, 3) Sekretion von entzündungsfördernden Zytokinen und Chemokinen (Interleukin (IL)-6, Interferon gamma (IFN- γ), IL-4 und Tumor-Nekrose Faktor beta (TNF- β) und damit die Beeinflussung von dendritischen Zellen, Makrophagen und regulatorischen T-Zellen, 4) Modulation der Antigen-Prozessierung und Präsentation (Abbildung 2) [6, 45, 48, 49].

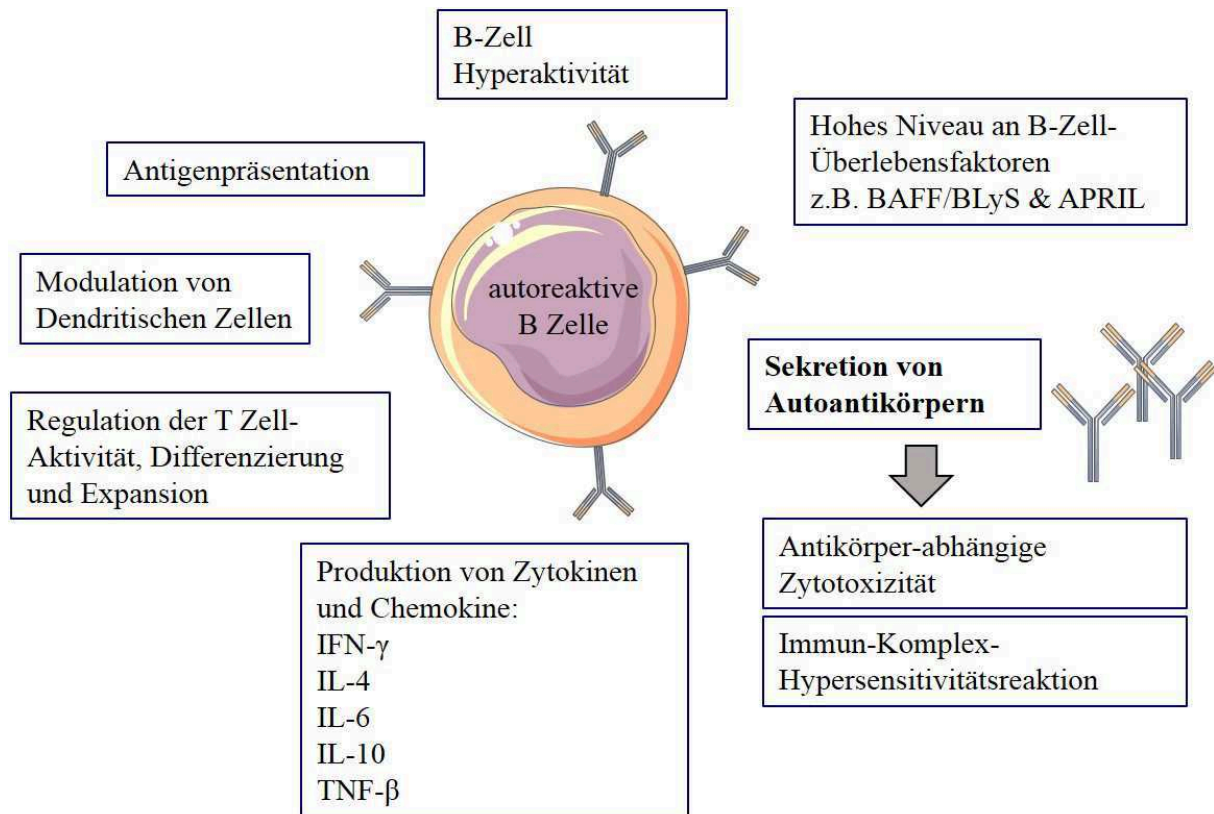


Abbildung 2: Übersicht zur Rolle autoreaktiver B-Lymphozyten.

Neben der Sekretion von Autoantikörpern und der damit verbundenen Antikörper-abhängigen Zytotoxizität sowie der Immunkomplex-Hypersensitivitätsreaktionen haben autoreaktive B-Zellen noch weitere biologische Funktionen. Dazu zählt die Antigen-Präsentation, wodurch die Modulation der Aktivität dendritischer Zellen und die Regulation der Aktivität, Differenzierung und Expansion von T-Zellen beeinflusst werden. Abkürzungen: APRIL- „a proliferation-inducing ligand“, B-Zellüberlebensfaktor; BLyS – B-Zellüberlebensfaktor; IFN – Interferon; IL – Interleukin; TNF – Tumornekrosefaktor.

Die Abbildung wurde modifiziert nach [14, 48].

Über die Antikörper-abhängige Funktion beeinflussen die Autoantikörper Rezeptorfunktionen, wie Aktivierung und Inhibierung, und unterstützen die Antigen-Aufnahme von Antigen-präsentierenden Zellen. Dabei werden die Antigen-Antikörper-Komplexe über den konstanten Bereich des Fc-Rezeptors der Makrophagen und der dendritischen Zellen aufgenommen [6].

Bei SLE-Patienten treten im Vergleich zu gesunden Menschen Verschiebungen der peripheren B-Zell-Subpopulationen auf. So finden sich z.B. eine erhöhte Frequenz transitorischer und CD38⁺-prä-germinal B-Zellen, CD27⁺IgD⁻ Gedächtnis-B-Zellen und CD27^{high} Plasmablasten im peripheren Blut [50]. Die CD27⁺IgD⁻ B-Zellen exprimieren dabei nur in geringer Anzahl den inhibitorischen Fc γ RIIB

beschriebenen VRT101 Epitop. Somit kommen diese K14-CD40L tg Mäuse als mögliches Mausmodell für nachfolgende *in vivo*-Studien in Frage.

Tabelle 14: Rekombinante murine Laminin-Proteinvarianten

* murines LAMa1-Peptid (AS 2640-2773; Antibody online GmbH), # unspezifische Bindung, Abkürzungen: AS – Aminosäure, DZ – Durchflusszytometrie, SLE – systemischer Lupus erythematodes, WB – Western Blot Analyse, XTT - Zellproliferationsassay

Laminin α 1 Protein- varianten	AS Sequenz	Funktionelle Domäne	MW [kDa]	Expressionssystem	Expressions- ausbeute [mg/l]	Bindung C72 / AK8 Antikörper - WB	Bindung C72 / AK8 Antikörper - ELISA	Bindung an C72 / AK8 Hybridom- zellen DZ	Zytotoxizität an C72 / AK8 Hybridom- zellen XTT	Autoantikörper Reaktion (K14- CD40L tg Maus Modell) ELISA
V4	2636- 2928		47,2	HEK 293T	0,2	ja [#] / ja	nein	nein		
			23,1	HEK 293T	3,4	ja [#] / ja	nein	nein		nein
G5	2899- 3079	ETA' SNAP	59,9	<i>E. coli</i> Rosetta 2 DE3	0,5			nein	nein	
			44,3	HEK 293T	1,1					
V6			18,7	<i>E. coli</i> Rosetta 2 DE3	0,2					
V6			18,7	<i>E. coli</i> BL21 DE3	0,8	ja [#] / ja	nein	nein		Tendenz
V6	2640- 2773	ETA'	58,1	<i>E. coli</i> BL21 DE3	1,2			nein	nein	
				<i>E. coli</i> ArticExpress						
V6		ETA'	58,3	DE3	0,5					
V6		SNAP	41,1	HEK 293T	-					
Kommerziell *	2640- 2773			<i>E. coli</i>						ja

V Diskussion

B-Lymphozyten sind durch eine Kombination aus Antikörper-vermittelten und Antikörper-unabhängigen Prozessen wesentlich an der Pathogenese der Autoimmunerkrankung Systemischer Lupus erythematoses (SLE) beteiligt [2, 51, 141, 142]. Eine Herausforderung bei der Behandlung dieser systemischen Autoimmunerkrankung ist die zielgerichtete Eliminierung von autoreaktiven Lymphozyten ohne gleichzeitige Zerstörung bzw. negative Manipulation gesunder Immunzellen, welches zur Verstärkung der Immunantwort und somit zu chronischen Entzündungen führen kann. Aktuelle Therapiestrategien wie die Hemmung der B-Zellentwicklung und -Aktivierung durch monoklonale Autoantikörper zeigen gute Erfolge bei SLE-Patienten mit moderatem Erkrankungsgrad [4, 59, 62]. Ein Beispiel hierfür ist der Antikörper Belimumab (anti-B-Zellüberlebensfaktor BLyS) [15, 18, 62]. Andere Biologika wie der monoklonale Antikörper Rituximab (anti-CD20) oder Atacicept (rekombinantes Fusionsprotein gegen die B-Zellüberlebensfaktoren BLyS und APRIL) haben jedoch innerhalb der klinischen Studien die primären Endpunkte nicht erreicht oder die klinischen Studien mussten aufgrund von unerwünschter Nebenwirkungen abgebrochen werden [4, 59]. Ein alternativer Ansatzpunkt zu den systemischen Behandlungsmethoden könnte die zielgerichtete Detektion und nachfolgende Eliminierung autoreaktiver B-Lymphozyten, insbesondere der Gedächtnis-B-Zellen über ihren spezifischen B-Zellrezeptor sein. Das Prinzip der Immuntoxine, welche ursprünglich für die zielgerichtete Depletion maligner Zellen entwickelt wurden [67], kann für die Herstellung von zielgerichteten Fusionsproteinen zur Eliminierung autoreaktiver B-Zell-Populationen verwendet werden. Dafür werden zielzellspezifische Antigen-basierte Fusionsproteine entwickelt. In der vorliegenden Arbeit wurde im ersten Abschnitt das Modellantigen TTC als Zellbindedomäne verwendet. Wesentliche Gründe dafür waren a) die Verfügbarkeit eines zellulären Testsystems in Form der TTC-reaktiven Hybridomzelllinie 5E4 [111] sowie b) die Verfügbarkeit von Blutproben Tetanus-immunisierten Blutspender, die für *ex vivo*-Studien an den isolierten Gedächtnis-B-Zellen herangezogen wurden. Somit konnte im ersten Abschnitt dieser Arbeit die Wirksamkeit des Fusionsproteins TTC-ETA' auf der Hybridomzelllinie 5E4 und auf frisch isolierten humanen B-Lymphozyten untersucht werden. Aktuelle Entwicklungsarbeiten zur De-Immuno-genisierung von Immuntoxinen sehen den Austausch der bakteriellen Toxine durch humane zytotoxisch wirksame Proteine vor. Entsprechend wurden in der vorliegenden Arbeit neue TTC-basierende Fusionsproteine mit humanen Enzymen als Effektordomänen hergestellt. Für die *in vitro*-Charakterisierung dieser neuen humanen zytolytischen Fusionsprotein wurde eine artifizielle humane lymphozytische TTC-reaktive REH Zelllinie generiert, um die neuen TTC-basierende Fusionsproteine auf ihre spezifische Zellbindung und ihre zytotoxische Wirksamkeit hin zu analysieren.

V.1 Charakterisierung TTC-basierter Fusionsproteine

V.1.1 Herstellung und Charakterisierung TTC-basierter Fusionsproteine an TTC-reaktiven Hybridomzellen und humanen B-Lymphozyten

Zur zielgerichteten Eliminierung einer TTC-spezifischen murinen Hybridomzelllinie sowie humaner TTC-reaktiver B-Lymphozyten aus dem peripheren Blut von immunisierten Individuen wurde zunächst das Fusionsprotein TTC-ETA' generiert. Die periplasmatische Expression unter osmotischen Stressbedingungen [143, 144] wurde von Barth und Huhn [145] entwickelt, um ausreichende Mengen funktionellen Immuntoxins herzustellen. Die erzielte Ausbeute des TTC-ETA' Proteins mit 1,9 mg/l (IV.1.1) liegt im ähnlichen Rahmen zu anderen Antigen-basierten Fusionsproteinen mit ETA', wie dem Autoimmuntoxin MOG-ETA' mit einer Proteinausbeute von 1 mg/l, oder mit DT als weiteres bakterielles Toxin [109, 146, 147]. Die prokaryotische Expression unter osmotischen Stressbedingungen bietet den Vorteil, lösliche Proteine aus dem Periplasma der *E. coli* Zellen gewinnen zu können. Dadurch sind intensive Rückfaltungsprozesse von Proteinen aus „inclusion bodies“, die bei einer Expression im Zytosol der *E. coli* Zellen durch Akkumulation der Proteine entstehen, nicht notwendig [148]. Ein weiterer Vorteil dieser Expressionsmethode ist die Skalierbarkeit, sodass eine größere Proteinmenge für ausstehende *in vivo*-Studien am Mausmodell hergestellt werden können.

Zur Gewährleistung der enzymatischen Aktivität des SNAP-tag innerhalb des SNAP-TTC-Fusionsproteins, wurde dieses Protein mit dem eukaryotische Expressionssystem den HEK 293T Zellen anstatt der periplasmatischen Expression in *E. coli* hergestellt [149]. Säugetierzellen als Expressionssystem bieten mit dem pMS-Vektorsystem [128] die Möglichkeit komplexe humane Proteine in löslicher und aktiver Form in den Zellkulturüberstand zu sekretieren, ohne dass ein Zellaufschluss sowie eine Eliminierung der Endotoxine wie das Lipopolyaccharid (LPS) notwendig ist [150-152]. Das pMS-System hat den Vorteil einen Selektionsdruck über das Antibiotikum Zeocin auf die transfizierten Zellen auszuüben, sodass nur positiv transfizierte HEK 293T Zellen expandieren und für die Proteinproduktion kultiviert wurden. Die Ausbeute von 6 mg/l des SNAP-TTC Proteins lag im ähnlichen Rahmen wie andere SNAP-Fusionsproteine, welche Antigene oder Antikörperfragmente („single chain variable fragments“, scFv) als Zellbindungsdomäne enthalten und eine Proteinausbeute von 2 bis 18 mg/l aufweisen [106-108, 153]. Anzumerken ist, dass sich innerhalb der TTC Aminosäure Sequenz sechs Glykosylierungssequenzen (N-X-S/T/C) befinden. Durch die Glykosylierung während der Expression steigt das theoretische Molekulargewicht von 75,9 kDa auf 89,3 kDa an. Da das rekombinante SNAP-TTC Protein nach Auftrennung und Visualisierung im SDS-PAA Gel, sowie im Western Blot bei einer Molekulargröße von über 80 kDa nachgewiesen wurde (Abbildung 6, IV.1.1), wird davon ausgegangen, dass dieses rekombinante Protein in glykosylierter Form vorliegt. Diese Glykosylierungen an der Zellbindungsdomäne des TTC-basierten Fusionsproteins haben keinen Einfluss auf die Kopplungsmöglichkeiten des SNAP-TTC Proteins an

Benzyguanin-modifizierten Fluoreszenzfarbstoffen. Durch den Kopplungsnachweis des SNAP-TTC Proteins an die Fluoreszenzfarbstoffe BG-488 bzw. BG-647 (Abbildung 7, III.2.9) konnte die effiziente, schnelle und irreversible Kopplungsmethode auch für das neue Antigen-basierte Fusionsprotein bestätigt werden [107, 108]. Die spezifische Kopplung von Fluoreszenzfarbstoffen an das TTC-Fusionsprotein bietet den Vorteil gezielte Lokalisationsstudien an verschiedenen Zelllinien durchzuführen, wie es in verschiedenen Studien mit scFv-SNAP Fusionsproteinen vorgenommen wurde [106, 107]. Dabei konnte durch die spezifische Zellbindung des SNAP-TTC-BG-647 Fusionsproteins an den murinen Hybridomzellen 5E4 bewiesen werden, dass der Kopplungsprozess keine Konformationsänderung der Zellbindungsdomäne bewirkt, im Gegensatz zu chemische Kopplungsmethoden mit reaktiven Reagenzien, die solche Konformationsänderungen verursachen können [154, 155]. Die irreversible Kopplung des SNAP-Fusionsproteins an Fluoreszenzfarbstoffe übt somit keinen Einfluss auf die spezifische Zellbindung aus [106, 108].

Zur Vorbereitung auf die Lokalisations- und Internalisierungsstudien der Antigen-basierten Fusionsproteine wurde die Rezeptordichte der Hybridomzellen bestimmt. Die TTC-reaktiven murinen Hybridomzelllinie 5E4 wiesen nur eine Rezeptordichte von ca. 1300 (Abbildung 9, IV.1.1) auf, welche mit dem $G\alpha M^{PE}$ Antikörper (III.1.6) und den „Quantibrite^{PE} Beads“ (III.1.6) in durchflusszytometrischen Analysen (III.2.14) bestimmt wurden. Im Gegensatz zu den Hybridomzellen, welche hauptsächlich für die Expression löslicher Antikörper vorgesehen sind [156], wurden auf einer IgD^+ murinen J558L δm /mb-1flN B-Zelllinie ~120.000 BZR-Komplexe mittels Transmissions Elektronenmikroskopie (TEM) nachgewiesen [157]. Bei dieser Studie wurden die fixierten B-Zellen mit einem spezifischen anti-IgD Antikörper, konjugiert an Goldpartikel, im Sättigungsbereich inkubiert und anschließend die Verteilung der IgD-BZR im Nanobereich auf der Zelloberfläche mittels TEM analysiert [157]. Aufgrund der unterschiedlichen Messmethoden zur Bestimmung der Rezeptordichte auf der Zelloberfläche kann ein direkter Vergleich der Werte nicht vorgenommen werden. Weiterhin ist anzumerken, dass sich die Anzahl der BZR (IgM, IgD) in den einzelnen B-Zellpopulationen im Präsentationsgrad auf der Zelloberfläche unterscheiden kann [158].

Nach Methoden basierend auf Aktivierungs- und Proliferationsstudien an isolierten B-Lymphozyten [139, 159-163] wurde eine kombinierte Stimulierung der Hybridomzellen über den „Toll-like“ Rezeptor (TLR) 4 mittels Lipopolysaccharid von *E. coli* Zellen [160, 162, 163] und über den Antigen-BZR Komplex mittels rekombinantem TTC als Antigen zur Erhöhung der Rezeptordichte vorgenommen. Hierbei konnte eine signifikant höhere Rezeptordichte der BZR (ca. 7-fach) nach 24 h ermittelt werden (Abbildung 9). Xu *et al.* demonstrierten, dass durch Inkubation von LPS aus der Maus isolierte Milz-B-Zellen verschiedene Faktoren, wie CD86, CD40, CD54, OXL40, MHC und IgM, hochreguliert werden konnten [164]. In der vorliegenden Arbeit konnte nur durch eine kombinierte Inkubation der Hybridomzellen mit LPS und dem Antigen eine erhöhte Anzahl an BZR auf der Zelloberfläche dokumentiert werden. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden konnte die

stimulierende Wirkung des LPS und TTC (jeweils 10 µg/ml) jedoch nicht mehr detektiert werden (Abbildung 9). Trotz der niedrigen Anzahl an BZR auf der Zelloberfläche, konnte die spezifische Zellbindungseigenschaft der TTC-Fusionsproteine erfolgreich bestätigt werden (Abbildung 8, IV.1.1). Die Internalisierungsstudie mit SNAP-TTC-BG-488 zeigt nach der Zellbindung eine Rezeptorvermittelte Endozytose des Protein-BZR-Komplexes, sodass nach 30 min eine Akkumulation des Proteins im Zytosol der Hybridomzellen vorlag (Abbildung 10, IV.1.1). Die Bindung und Internalisierung des TTC-Fusionsproteins innerhalb von 30 min liegt im vergleichbaren Rahmen zu anderen Antigen-basierten Internalisierungsstudien an humanen oder murinen B-Lymphozyten, wie z.B. bei den Studien von Chaturvedi *et al.*, bei der die Antigen-BZR Komplexe ebenfalls nach 30 min in Vesikeln internalisiert in Maus IgM⁺ B-Zellen aus der Milz mittels Konfokalmikroskopie dokumentiert werden konnte [165-168]. Die Dokumentation des Internalisierungszeitraumes ist für die Ermittlung der Wirksamkeit neuer zytotoxischer Fusionsproteine ein wichtiger Parameter [169], sodass durch eine schnelle Internalisierung innerhalb von 30 min das Nebenwirkungspotenzial des Fusionsproteins minimiert vorläge.

Neben der spezifischen Zellbindung des TTC-ETA' Proteins (Abbildung 8, IV.1.1) konnte die Zytotoxizität des TTC-ETA' an den TTC-reaktiven Hybridomzellen erfolgreich ermittelt werden. Dabei hat das TTC-ETA' Protein mit einer mittleren effektiven Konzentration (EC₅₀ Wert) von 1,3 nM (152 ng/ml, Abbildung 11, IV.1.1) eine vergleichbare Zytotoxizität wie das Autoimmuntoxin MOG-ETA' [109] mit einem mittleren-inhibitorischen Konzentration (IC₅₀) von 0,66 nM, welches zur Depletion MOG-reaktiver B-Lymphozyten bei der multiplen Sklerose für präklinische Studien entwickelt wurde. Der ermittelte EC₅₀-Wert für das TTC-ETA' Protein ist aber höher als bei ETA-basierten Immuntoxinen, die z.B. für B-Zell-basierte Krebserkrankungen sich in der Entwicklung befinden und IC₅₀-Werte von 0,5 bis 100 ng/ml bei *in vitro*- und präklinischen Phase I Studien aufweisen [170, 171]. Die Zytotoxizität der Autoimmuntoxine hängt nicht nur von der schnellen Zellbindung und Internalisierung, sowie Freisetzung der Effektor-domäne im Zytosol der Zelle ab, sondern wird zusätzlich durch die Sekretion von Autoantikörpern beeinflusst. Die in der Peripherie vorhandenen Autoantikörper komplexieren das Autoimmuntoxin, wodurch die gezielte Zellbindung verhindert und die Wirksamkeit des Autoimmuntoxins herabgesetzt wird. Dieses Phänomen findet auch *in vitro* beim Zellviabilitätsassay mit den Hybridomzellen statt. Dies begründet den geringfügig höheren EC₅₀-Wert des TTC-ETA' Proteins im Vergleich zu den Krebstherapeutika.

Im nächsten Schritt wurde die spezifische Bindung der rekombinanten TTC-Fusionsproteine an Plasmazellen untersucht, die aus polyklonal aktivierten B-Zellen der Blutspender gewonnen wurden. Die Daten zeigen eine zellspezifische Bindung des SNAP-TTC-BG-647 an CD19⁺-TTC-reaktiven Plasmazellen im erwarteten Frequenzbereich von 0,1%, wie in der Studie von Odendahl *et al.* ebenfalls ermittelt wurde [54]. Wegen der geringen Frequenz TTC reaktiver B-Zellen ohne direkt vorausgegangene Immunisierung, erwies sich der Nachweis der direkten Bindung des rekombinanten

TTC Proteins an TTC⁺/CD27⁺ Gedächtnis-B-Zellen als technisch unmöglich. Dennoch demonstrieren die Ergebnisse der parallel durchgeführten funktionellen Analyse, dass das rekombinante TTC-ETA' Protein durch eine spezifische Zytotoxizität charakterisiert ist, die durch die Eliminierung von TT bzw. TTC positiven Gedächtnis-B-Zellen (Abbildung 13B und 12D, IV.1.2) mittels B-Zell-ELISpot erfolgreich nachgewiesen wurde. Gleichzeitig wurde dokumentiert, dass die allgemeine IgG-Produktion und somit alle anderen IgG sezernierenden B-Zellen nicht durch einen unspezifischen toxischen Effekt des rekombinanten TTC-ETA' Fusionsproteins beeinflusst wurden (Abbildung 13, IV.1.2). Bei diesen ELISpot Analysen zeigt sich, dass die immunisierten TT-reaktiven Spender neben den TTC-reaktiven Gedächtnis-B-Zellen auch noch weitere Gedächtnis-B-Zellen gegen andere Bereiche des Tetanustoxins aufweisen. Diese anderen TT-reaktiven Gedächtnis-B-Zellen werden von dem TTC-ETA' Protein, aufgrund fehlender Antigen-BZR-Reaktion, nicht gezielt eliminiert (0,7 % TT/IgG-ASC verbleibend, Abbildung 13). Trotzdem konnte die Hypothese der spezifischen depletierenden Wirkung des rekombinant hergestellten TTC-ETA' Autoimmuntoxins auf humanen TT/TTC-reaktiven Gedächtnis-B-Zellen bestätigt werden.

Die vorliegenden Ergebnisse sind die ersten Studien, in denen die depletierende Wirkung eines rekombinant hergestellten Antigen-ETA'-Fusionsproteins auf humane Gedächtnis-B-Zellen ermittelt wurden, welche die vorangegangenen Studien von Volkman *et al.* [172] bzw. Gailer *et al.* [173] mit anderen Antigen-basierten Immuntoxinen untermauern und erweitern. Im Gegensatz zu der hier verwendeten rekombinanten Herstellung des Antigen-basierten Fusionsproteins mit ETA' als toxische Domäne, wurde in der Studie von Volkman *et al.* das Tetanustoxin als Antigen über eine Thioether Bindung an das pflanzliche Toxin Rizin als Effektorprotein chemisch konjugiert [172]. Diese chemische Kopplung bedeutet zusätzliche Laborprozesse zur Abtrennung von ungebundenen Toxin, die den Herstellungsprozess von Immuntoxinen verkomplizieren und die Herstellungskosten erhöhen. Nachteile dieser chemischen Kopplung sind die Heterogenität des gekoppelten Konstrukts und die Veränderung der Binde-Eigenschaften [154].

Weiterhin ist anzumerken, dass im Vergleich zu den hier beschriebenen *ex vivo*-Untersuchungen mit humanen Gedächtnis-B-Zellen andere Antigen-basierte Fusionsproteine für neue Behandlungsstrategien der multiplen Sklerose, wie z.B. MOG-ETA' [109] oder MOG-DT [147] nur in Mausmodellen auf ihre Antigen-spezifische Depletion hin untersucht wurden und noch keine weiteren Daten mit humanen Material vorliegt. Stepanov *et al.* konnte bei der unspezifischen Toxizität des MOG-DT Fusionsproteins bei halbmaximalen „lethal doses“ (LD₅₀)-Studien in den Balb/c Mäusen ausschließen [147]. Diese Studien zeigen, dass eine gezielte BZR-Bindung und schnelle Internalisierung des rekombinanten Fusionsproteins an den Zielzellen erfolgt, ohne dass es zu einer unspezifischen Phagozytose oder Pinozytose durch Makrophagen oder andere Immunzellen kommt. Dies vermindert das Risiko von Immunsystem-vermittelter systemischer Nebenwirkungen. Jedoch muss mit der Bildung von neutralisierenden Antikörpern gegen die Effektordomäne bzw. anti-

Rezeptor [48, 51]. Einige B-Zell-Subpopulationen, wie z.B. CD27⁺IgD⁻CD95⁺CD10⁻ Gedächtnis-B-Zellen mit aktiviertem Phänotyp und CD27⁺⁺CD20⁻CD38⁺⁺HLA-DR^{high} Plasmablasten stehen im Zusammenhang mit der Krankheitsaktivität und dem anti-dsDNA Antikörpertiter bei SLE-Patienten [50, 52-54]. Weiterhin ist die Subpopulation der IgM⁺CD27⁺IgD^{+/-}CD38⁻ Gedächtnis-B-Zellen aufgrund des beschleunigten Klassenwechsels vermindert [55].

I.3 Therapieansätze zur SLE Behandlung

Aktuell existieren verschiedene Therapieansätze, die zur Behandlung des SLE eingesetzt werden. Standardisiert werden Immunsuppressiva oder immunmodulierende Substanzen zur Herstellung der immunologischen Homöostase und der Unterdrückung der Immunantwort eingesetzt [2, 56]. Hierzu zählt das Antimalariamittel Hydroxychloroquin, welches die „Toll-like“ Rezeptor (TLR) - Aktivierung inhibiert und somit zur Reduktion der Interferon alpha (INF- α) Freisetzung führt [57, 58]. Hydroxychloroquin übt einen Effekt auf a) akute Entzündungen durch z.B. Inhibierung der Histaminwirkung, b) chronische Entzündungsreaktionen durch Reduzierung der Lymphozytenproliferation oder der Zytokinproduktion sowie c) weitere zelluläre Funktionen aus [57]. Kortikosteroide, wie Glukokortikoide werden hauptsächlich zu Beginn der SLE Erkrankung verabreicht. Glukokortikoide inhibieren die B- und T-Zell Immunantwort und die damit verbundenen Effektorfunktionen auf Monozyten und Neutrophile, da sie die Aktivität des Transkriptionsfaktors Nuklearfaktor-kappaB (NF- κ B) hemmen [59]. Weitere Immunsuppressiva sind Cyclophosphamid (CTX) und Mycophenolat Mofetil (MMF), wobei das MMF ein Inhibitor der Purinsynthese ist und somit die Proliferation aktivierter B- und T-Zellen blockiert. Azathioprine (AZA) ist ein Purinanalogen, welches eine wichtige Rolle bei der Behandlung des SLE einnimmt. Dieses Immunsuppressivum wird im Lebergewebe und den Erythrozyten in Mercaptopurin umgesetzt, welches die DNA-Synthese hemmt und die Proliferation der Immunzellen stoppt [59]. DNA- und auch RNA-Synthese werden auch durch Methotrexat (MTX) inhibiert. MTX ist ein Folsäure-Analogen und somit ein kompetitiver Inhibitor der Dihydrofolatreduktase, das die Nukleinsäuresynthese inhibiert [59]. Dosis und Therapieintervalle der entzündungshemmenden Substanzen sind Gegenstand aktueller Studien, mit dem Ziel durch eine optimale Therapie möglichen End-Organschäden vorzubeugen [60]. Jedoch erweisen sich einige B-Zell-Subpopulationen nur eingeschränkt sensibel auf herkömmliche Therapien. So fanden sich beispielsweise nach einer drei bis sechs-monatigen Cyclophosphamid-Bolus-Therapie bei SLE-Patienten weiterhin erhöhte Frequenzen und stabile Zahlen CD27⁺ Gedächtnis-B-Zellen [61].

Hinzu kommt, dass die Verwendung von Immunmodulatoren und Immunsuppressiva einen systemischen Effekt auf das Immunsystem ausüben und sowohl pathogene als auch fremdantigen-spezifische Immunzellen ausschalten. Neuere Therapieansätze sind auf eine gezielte Eliminierung der pathogenen Immunzellen fokussiert. Zum Einsatz kommen dabei rekombinante monoklonale

gebildet werden können, sodass das Fusionsprotein abgebaut und ausgeschieden würde bevor es den Wirkort, die autoreaktive B-Zelle, erreicht. Dies verringert die therapeutische Effizienz der Autoimmuntoxine. Durch eine zusätzliche Vorabbehandlung der Patienten mit einer Plasmapherese, bei der das Autoantigen an die Matrix gebunden wäre, könnte die Autoantikörperkonzentration im Blut temporär reduziert werden. Dieser Therapieansatz wurde von Amital *et al.* bei einer kleinen Auswahl von SLE-Patienten durch Kopplung des VRT101 Peptid an eine Sepharose-Matrix erfolgreich angewendet [40]. Anschließend könnte dann die gezielte Medikation des Autoimmuntoxins begonnen werden.

Die Titer von Autoantikörpern und neutralisierenden Antikörpern sollten deshalb im Falle klinischer Studien zur Untersuchung der Wirkung von Autoimmuntoxinen regulär bestimmt werden. Für die Etablierung von Autoimmuntoxinen ist die Bestimmung der Pharmakokinetik und Pharmakodynamik hinsichtlich der einzuschätzenden Effizienz des Fusionsproteins wichtig. In diesem Zusammenhang könnte die neu entwickelte Methode von Schneider *et al.* [180] zur Bestimmung der Grenzpunkte der Wirksamkeit von Immuntoxinen bei der Existenz von neutralisierenden Antikörpern anhand von Serumproben der Patienten eingesetzt werden. Die Verminderung der Konzentration von Autoantikörpern im Plasma sollte die Effizienz des Autoimmuntoxins bei gleichzeitiger Verminderung von Nebenwirkungen durch fehlende Immunkomplex-Bildung verbessern.

V.1.2 Herstellung und *in-vitro* Charakterisierung TTC-basierter humaner Fusionsproteine an den neu generierten humanen TTC-reaktiven REH-Zellen

Im nächsten Schritt wurde die bakterielle Toxindomäne durch verschiedene humane Effektordomänen ausgetauscht, um die potentielle Immunogenität der Proteine zu reduzieren. Als humane Effektordomänen wurde die Granzym B-Mutante R201K und das mutierte MAPTau Protein ausgewählt. Die TTC-basierten Fusionsproteine (GrB(R201K)-TTC und TTC-MAPTau) konnten erfolgreich mithilfe zuvor transfizierter HEK 293T Zellen exprimiert werden (Abbildung 14B, IV.2.1). Die Proteinausbeute für GrB(R201K)-TTC liegt mit 4,5 mg/l in vergleichbarer Größenordnung wie andere GrB(R201K)-Fusionsproteine (Proteinausbeute von 1 bis 30 mg/l) [85, 87, 95]. Um eine toxische Wirkung des Granzyme B-Fusionsproteins auf die HEK 293T Zellen während der Expression zu vermeiden, wurde das Fusionsprotein als Prä-Protein mit einer N-terminal lokalisierten Enterokinase-Schnittstelle exprimiert. Dadurch wird das Granzym B erst nach einem Enterokinaseverdau enzymatisch aktiv. Mithilfe des Granzym B-Substratassays konnte die erfolgreiche *in vitro*-Aktivierung nach dem Enterokinaseverdau demonstriert werden (Abbildung 15, IV.2.1).

Für das TTC-MAPTau Protein konnte eine Proteinausbeute von bis zu 1,6 mg/l erzielt werden. Im Vergleich dazu wurden für andere MAPTau Fusionsproteinen, wie Ki4scFV-MAP und anti-EpCAMscFV-MAP eine Proteinausbeute bis zu 1 mg/l beschrieben. Allerdings wurden Ki4scFV-MAP und anti-EpCAMscFV-MAP wurden jedoch in *E. coli* Zellen exprimiert [105, 181]. Gegenüber der Expression in *E.coli* Zellen bietet die hier angewendete Expression in HEK 293T Zellen den

Vorteil der Endotoxin-freien Produktion des rekombinanten Proteins, sodass keine zusätzlichen Reinigungsschritte zur Entfernung der Endotoxine angestrebt werden müssen. Weiterhin ist kein Zellaufschluss und damit verbundene mögliche Verunreinigung durch Fremdprotein notwendig. Bei Analysen unter Verwendung des XTT-Zellviabilitätsassays stellte sich heraus, dass sowohl GrB(R201K)-TTC als auch TTC-MAPTau keine zytotoxische Aktivität auf die murine Hybridomzelllinie 5E4 und somit keine Kreuzreaktivität aufweisen (Abbildung 15, IV.2.1). Das bedeutet, dass die humanen Effektor-domänen eine Spezies-spezifische enzymatische Aktivität haben und deren Aktivität nur mit humanen Zellen ihre pro-apoptotische Wirksamkeit überprüft werden kann. Somit war die TTC-reaktive Hybridomzelllinie 5E4 nicht für die *in vitro*-Charakterisierung dieser humanen Fusionsproteine geeignet. Um erste *in vitro* Parameter der neuen humanen Antigen-basierten Fusionsproteine zu ermitteln, wurden humane lymphozytische Pro-B-Zellen (REH-Zelllinie) für die Generierung von anti-TTC-reaktiven Zellen ausgewählt. Die Transposon-basierte Gentransfer Methode, Transpo-mAb®, ermöglichte die effiziente Generierung von TTC-reaktiven humanen lymphozytischen REH-Zellen. Nach relativ kurzer Laborzeit (2-3 Monaten) im Vergleich zur Herstellung von geeigneten (humanen) Hybridomzellen stand eine angereicherte TTC-reaktive REH-Zellpopulation für die *in vitro*-Charakterisierung der humanen TTC-Fusionsproteine zur Verfügung. Die angewendete Gentransfer-Methode zeichnet sich durch eine schnelle und robuste Transfektion von humanen Zellen unter Verwendung der *piggyBac* Transposase aus. Diese Ergebnisse werden durch verschiedene Gentransfer-Studien untermauert, wie von Nakazawa *et al.* und Saha *et al.*, die jeweils mit der *piggyBac* Transposase Modifikationen von humanen T-Lymphozyten für die Anwendung in der zielgerichteten Gentherapie durchgeführt haben [118, 120, 122, 125].

Für die TTC-reaktiven REH-Zellen konnte eine Rezeptordichte von ~ 2000 α -TTC-IgG Antikörpern auf der Zelloberfläche detektiert werden (Abbildung 18, IV.2.2.2). Im Gegensatz zur IgD⁺ murinen J558L δ m/mb-1fIN B-Zelllinie mit ~120.000 BZR-Komplexe nachgewiesen [157], Nachweismethode im Abschnitt V.1.1 diskutiert, haben die neu generierten TTC-reaktiven REH Zellen mit ~2000 α -TTC-IgG nur eine geringe Anzahl an Oberflächen-IgGs zum Zeitpunkt der Kultivierung. Diese Anzahl ist jedoch vergleichbar mit der Anzahl an α -TTC-IgG Antikörpern auf den Maushybridomzellen 5E4 (Abbildung 9, IV.1.1). Mittels induzierten Transkriptionsregulatoren innerhalb der Transposon-basierten DNA-Abschnitte der Expressionsvektoren, wie z.B. mit dem Tetracyclin-kontrollierten Transaktivator (tTA) könnte die Expression der membrangebundenen Immunglobuline gezielt induziert und um ein Vielfaches erhöht werden [182-184]. Für die *in vitro*-Charakterisierung der GrB(R201K)-TTC und TTC-MAPTau Fusionsproteine war diese Anzahl der Oberflächen IgGs ausreichend, sodass nach positiver spezifischer Zellbindung der TTC-Fusionsproteine (Abbildung 19, IV.2.3.1) das Internalisierungsverhalten und die pro-apoptotische Wirkung dieser Fusionsproteine an den humanen TTC-reaktiven REH-Zellen getestet werden konnte. Anzumerken ist, dass Granzyme B aufgrund seines hohen isoelektrischen Punktes (pI = 9,7) und der positiven Oberflächenladung [83, 88, 185] zu einem sehr geringen Anteil unspezifisch an TTC-reaktiven aber auch an Mock-reaktive REH-

Zellen bindet. Dieses Phänomen ist kein Einzelfall, sondern konnte auch bei anderen Zelllinien beobachtet werden [83, 185]. Im nächsten Schritt wurde das Internalisierungsverhalten mittels dem SNAP-TTC-647 untersucht. Das SNAP-TTC-647 Protein bindet spezifisch an die TTC⁺-REH-Zellen und löst eine Rezeptor-vermittelte Endozytose aus (Abbildung 20, IV.2.3.2). Wie auch bei dem Internalisierungsverhalten des SNAP-TTC-488 Proteins an den TTC-reaktiven murinen Hybridomzellen 5E4, kann bei den humanen REH-Zellen durch die vergleichbare Internalisierungszeit des Antigens-BZR-Komplexes innerhalb von 30 min, wie bei den bereits beschriebenen Vergleichsstudien von z.B. Chaturvedi *et al.* an isolierten B-Lymphozyten [165-167], auf den lymphozytischen Charakter der verwendeten Zellen geschlossen werden. Da in den Untersuchungen von Matsuo *et al.* [186] das Vorhandensein der CD79 (Ig α und Ig β) Rezeptoren auf den REH-Zellen beschrieben wurde, kann davon ausgegangen werden, dass in den transfizierten und TTC⁺ REH-Zellen ein vollständiger BZR-Komplex auf der Zelloberfläche ausgebildet wird und es nach Antigenbindung eine vollständige Signalvermittlung der BZR-Signalkaskade hin zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, wie dem NF- κ B, kommen kann [187]. Somit konnte die Eignung der TTC-reaktiven REH-Zellen als zelluläres Testsystem für die *in vitro*-Charakterisierung der humanen TTC-Fusionsproteine bestätigt werden.

Das Fusionsprotein TTC-ETA' zeigte eine konzentrationsabhängige Zytotoxizität auf TTC-reaktive REH-Zellen, sodass eine mittlere effektive Konzentration von 0,7 nM ermittelt werden konnte (Abbildung 21, IV.2.3.3). Dieser EC₅₀-Werte ist im Vergleich zu Zellvitalitätsstudien mit den TTC-reaktiven murinen Hybridomzellen niedriger. Durch die Sekretion von anti-TTC Antikörpern der Hybridomzellen während der Behandlungsdauer ist die Wirksamkeit des TTC-ETA' Proteins durch Antikörper-Komplexierung vermindert. Im Fall der TTC⁺ REH Zelle werden keine löslichen anti-TTC Antikörper von den transfizierten Zellen sekretiert, sodass für das TTC-ETA' Protein eine geringen EC₅₀-Wert gegenüber den Analysen mit murinen Hybridomzellen 5E4 dokumentiert werden konnte. Das GrB(R201K)-TTC Fusionsprotein weist ebenfalls eine spezifische konzentrationsabhängige Toxizität auf die humanen TTC-reaktiven REH-Zellen auf (Abbildung 21, IV.2.3.3). Für GrB(R201K)-TTC konnte mit 5 nM eine Toxizität detektiert werden, welche geringer bzw. im vergleichbaren Rahmen wie z.B. die Krebstherapeutika GbR201K-Ki4(scFV) mit 1.7 nM auf L540cy Zellen oder GbR201K-scFV1711 mit 21,1 nM auf RD Zellen ist [82, 85, 87, 93, 95]. Dies sind erste Hinweise, dass das Granzym B als Effektor-domäne für die zielgerichtete Eliminierung einer autoreaktiven B-Zellpopulation eingesetzt werden könnte. Jedoch sind mehr als 50% der TTC-reaktiven REH-Zellen nicht durch die Zugabe von GrB(R201K)-TTC Fusionsprotein in ihrem Proliferationsverhalten innerhalb des experimentellen Rahmens (72h) beeinflusst wurden. Ein entscheidender Punkt, damit das Autoimmunotoxin aktiv werden kann, ist die Freisetzung aus den Endosomen ins Zytoplasma der Zielzelle. Das Wildtyp GrB hat die Fähigkeit ohne weitere Zellbindungsdomäne in die Zielzelle über Vesikelbildung zu internalisieren, kann aber ohne gleichzeitigem Vorhandensein von Perforin nicht ins Zytoplasma gelangen und dort aktiv sein [188,

189]. Zur Verbesserung der Effizienz der humanen Fusionsproteine als Autoimmuntoxine könnte der gleichzeitige Einsatz von Chloroquin (CQ)/Hydroxychloroquin (HCQ), welches bei Krebstherapiestudien mit Immuntoxinen und humanen Fusionsproteinen eine Verbesserung der Effizienz gezeigt hat, überlegt werden [87, 93, 185, 190-193]. In einer Studie konnten Dälken *et al.* zeigen, dass die rekombinant in *Pichia pastori* hergestellten GrB Fusionsproteine erst durch die Zugabe von Chloroquin eine selektive Toxizität im piko- bis nanomolaren Bereich auf epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor-(EGFR)-positive Krebszellen (MDA-MB468) aufwiesen [93]. Dieser Effekt konnte auch von Niesen *et al.* bestätigt werden. Hier wurde beobachtet, dass erst durch gleichzeitige Behandlung der Krebszellen mit 50 μ M Chloroquin und dem Fusionsprotein GrBR201K-scFv1711, welches auch gegen EGFR-positive Krebszellen (RD-Zellen) gerichtet ist, eine halbmaximale inhibitorische Konzentration (IC_{50}) von 21,1 nM erreicht wird. Dieses GrBR201K-scFv1711 Fusionsprotein wurde wie das GrB(R201K)-TTC Protein in HEK 293T Zellen hergestellt und induziert bei gleichzeitiger CQ Gabe zu 70% Apoptose auf EGFR-positive RD-Zellen [87].

Das CQ bzw. HCQ akkumuliert in den sauren Kompartimenten, wie dem späten Endosom und Lysosom und wirkt dort auf das pH Gleichgewicht, sodass es zur Zerstörung der Vesikel führt [57, 93]. CQ und HCQ sind zugelassene Medikamente und werden aktuell bei der Behandlung des SLE bei der Mehrheit der Patienten eingesetzt. Diese Substanzen weisen einen entzündungshemmenden Charakter auf, welcher durch eine Unterdrückung der Antigen-Präsentation, Inhibierung der Prostaglandin- und Zytokinsynthese, sowie Beeinflussung der TLR-Signalwege und Leukozytenaktivierung begründet ist [57, 194]. Die Unterdrückung der Autoantigen-Präsentation ist besonders bei Autoimmunerkrankungen von Interesse. Hierbei wird durch die Erhöhung des pH-Werts im Lysosom bei Antikörper-sekretierenden Zellen die Peptid-Beladung geändert, wodurch die Bindung (mit geringer Affinität) der Autoantikörper an den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) Klasse II Molekül verringert wird [194, 195]. Dabei bleibt jedoch die hochaffine Bindung von exogenen Antigenen unbeeinflusst. HCQ weist schützende Effekte hinsichtlich der betroffenen Endorgane auf. Die anti-Malaria-Substanzen zeigen bei SLE- und LN-Patienten verschiedene positive Effekte, wie die Verbesserung der Überlebensrate und eine Reduktion der Krankheitsschübe sowie der Krankheitsaktivität und eine damit verbundene Verminderung neuer Organschäden bei gleichzeitig verminderten Infektionsraten [57, 194]. Anti-Malaria Substanzen bieten mehr Vorteile als Nebenwirkungen für SLE- und LN-Patienten. Die Kombination dieser Substanzen mit Autoimmuntoxinen lassen additive Effekte erwarten. Durch die zielgerichtete Zellbindung des GrB(R201K)-Fusionsproteins an Gedächtnis-B-Zellen und eine schnelle Rezeptor-vermittelte Internalisierung ist davon auszugehen, dass das GrB gezielt in diesen B-Zellen aktiv ist und keine weiteren Autoantigene durch Granzym-Spaltung erzeugt [196]. GrB-sensitive Konformationen wurden gerade bei Antigenen, die krankheitsrelevant in den Geweben von Patienten mit systemischer Autoimmunerkrankung vorkommen, dokumentiert [196]. Dieser Aspekt, das Granzyme B bei der

Antikörper. Die Wirkweise dieser monoklonalen Antikörper kann in vier Gruppen unterteilt werden: 1) Ligand Blockierung, 2) Rezeptor Blockierung und Rezeptormodulation, 3) Erniedrigung des Zielrezeptors auf der Zelloberfläche und 4) Depletion antigenpräsentierender Zellen [10, 62]. Weiterhin können B-Zell gerichtete Wirksubstanzen für die Behandlung von Autoimmunerkrankungen in fünf Klassen unterteilt werden (Tabelle 1).

Tabelle 1: Mechanismen der zielgerichteten B-Zell-Beeinflussung, modifiziert nach [2, 59]

Klasse	Mechanismus
1	Blockierung von B-Zellen mithilfe mAk (anti-CD19, -CD20, -CD22)
2	Neutralisierung der Überlebensfaktoren BAFF und APRIL
3	Substanzen, die über den B-Zellrezeptor (BZR) oder über BZR-assoziierte Transmembran-Signalproteine wie z.B. CD79 Apoptose induzieren
4	Ablösen der gebildeten "ectopic germinal center" durch Antikörper gegen den Lymphotoxin- β -Rezeptor
5	Inhibition der Zytokine durch Antikörper gegen Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF- α), IL-1, IL-6, IL-10, IL-15 und IL-18

Für die direkte B-Zellblockierung wurden verschiedene Antikörper (humane, chimäre) entwickelt, welche eine Reaktivität gegen CD19, CD20, CD22 oder die B-Zell-Überlebensfaktoren BAFF und APRIL aufweisen [4, 59, 62].

Rituximab ist ein anti-CD20 chimärer (human/muriner) monoklonaler Antikörper. 1997 wurde dieser zunächst für die Behandlung von B-Lymphomen von der „Food and Drug Administration“ (FDA) zugelassen [59]. Der CD20-Rezeptor wird auf prä-B-Zellen sowie reifen B-Zellen exprimiert, jedoch nicht auf den Plasmazellen. Dabei wirkt dieser monoklonale Antikörper über die Antikörper-abhängige, zellvermittelnde Zytotoxizität (ADCC) sowie die Komplement-vermittelte Zellyse und Apoptose [59]. Im Gegensatz zu dem erfolgreichen Einsatz bei RA-Patienten konnten in den klinischen Studien der Phase III (EXPLORER und LUNAR) für SLE-Patienten die festgelegten primären Endpunkte nicht erreicht werden [15, 62]. Bei der vollständig humanisierten Variante des monoklonalen anti-CD20 Antikörpers, dem Ocrelizumab, wurden die klinischen Studien der Phase III aufgrund von erhöhten Infektionsraten frühzeitig abgebrochen [15].

Ursprünglich für die Behandlung von B-Zell Malignitäten entwickelt worden ist Epratuzumab, ein vollständig humaner monoklonaler Antikörper gegen den CD22-Rezeptor [15]. Der CD22-Rezeptor befindet sich im Zytoplasma unreifer B-Zellen und wird nach Reifung auf der Oberfläche von z.B. Gedächtnis-B-Zellen und Plasmazellen exprimiert [15, 18]. Epratuzumab bewirkt eine schnelle Internalisierung des CD22-Rezeptors, welches eine Phosphorylierungssignalkaskade auslöst, die damit endet, dass Bestandteile des BZR-Komplexes wie CD19, CD79 β und CD21 von der Zelloberfläche

neue therapeutische Ansätze zur gezielten Eliminierung von autoreaktiven B-Zellen für weitere präklinische Untersuchungen und Weiterentwicklung der Therapiestrategie zur Verfügung.

V.2 Technologietransfer auf ein krankheitsrelevantes Autoantigen beim SLE

Die erfolgreiche Eliminierung von TTC-reaktiven humanen Gedächtnis-B-Zellen durch ein antigen-basiertes Autoimmuntoxin zeigt die generelle Machbarkeit des Therapieansatzes auf. Durch den Plattform-Charakter der verwendeten Expressionsvektoren (pBM- und pMS) [72, 128] ist eine gezielte und schnelle Herstellung von Autoimmuntoxinen bzw. humaner zytotoxischer Fusionsproteine möglich. Als Bindungsligand sollte das zu untersuchende Autoantigen rekombinant mit den Expressionssystemen als lösliches Protein herzustellen sein. Ziel ist es ein rekombinantes lösliches Fusionsprotein ohne aufwendige und laborintensive Prozesse herstellen zu können, um einen nachfolgenden Produktions-Upscale zu ermöglichen.

Beim SLE spielen die Bildung und Ablagerung von Immunkomplexen in den Glomeruli der Nieren, Blutgefäßen, Haut und im Gehirn (Choroid plexus) als pathogene Mechanismen eine Rolle [32]. Durch die interessanten Ergebnisse von Amtial *et al.*, welche die Laminin α 1-Kette als mögliches pathogenes Autoantigen in LN-Patienten identifiziert haben [32, 40], wurde im Rahmen dieser Arbeit der Fokus auf dieses Autoantigen, insbesondere auf die C-terminalen LG-Domänen der α 1-Kette gelegt.

V.2.1 Herstellung und Charakterisierung von humanen Laminin α 1-Proteinvarianten

Die Expression der humanen Laminin α 1-Proteinvarianten (hLAMA1) wurde in *E. coli* Rosetta™ 2 (DE3) Zellen (III.1.7), welche sieben zusätzliche tRNAs für die Ablesung der in *E. coli* selten vorkommenden Codons AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA beinhalten, oder mit transfizierten HEK 293T Zellen (III.1.9) durchgeführt. Dabei konnten jedoch keine löslichen Proteine der Proteinlängenvarianten hLAMA1-V1 (MW 13,8 kDa) oder hLAMA1-V2 (MW 16,2 kDa) in den jeweiligen Expressionssystemen generiert werden. Erst durch die genetische Fusion des hLAMA1-V2 an die modifizierte ETA' Variante war eine Expression in *E. coli* Zellen möglich, sodass nach Zellaufschluss (III.2.8.1) und Proteinreinigung (IMAC, III.2.8.2, Abbildung 25) das lösliche Protein vorlag. Die Proteinausbeute dieses ETA'-Fusionsproteins ist sehr gering und liegt mit 0,2 mg/l weit unterhalb zum Modell-Autoimmuntoxin TTC-ETA' (1,9 mg/l) und anderen ETA-basierten Fusionsproteinen, wie dem MOG-ETA' (1 mg/l) als Beispiel für ein Autoimmuntoxin mit humanem Autoantigen als Zellbindungseinheit [109]. Im Gegensatz zu den hLAMA1-V1 bzw. V2-Proteinvarianten konnte das hLAMA1-V3 Protein in *E. coli* Rosetta™ 2 (DE3) mit einer Proteinausbeute von 153 mg/l exprimiert und gereinigt werden (Abbildung 25). Dieses Protein unterscheidet sich nur marginal in der Proteingröße (MW 14,2 kDa) von hLAMA1-V1 bzw. V2-Proteinvarianten, weist aber die von Amtial *et al.* beschriebene Peptidsequenz VRT101 [32] C-

terminal auf. Bei ersten Vorstudien mit Hybridomüberständen der anti-DNA/anti-Laminin Hybridomzellen C72 [131] konnte in Western Blot Analysen unspezifische Reaktionen des C72 Antikörpers auf die verschiedenen murinen und humanen Lamininproteinvarianten, sowie das Kontroll-Protein TTC nachgewiesen werden (Abbildung 29, IV.3.3). Der C72 Antikörper weist eine Spezifität gegen Einzelstrang bzw. Doppelstrang DNA mit Präferenz zur Einzelstrang DNA auf [131]. Die murinen B-Zellen, die den C72 Antikörper sekretieren sind aus einem Mausmodell (NZB/NZW F1, MRL, BXSB), welches SLE-ähnliche Symptome spontan entwickelt, isoliert worden. Diese C72-sekretierenden Zellen wurden mittels der Hybridomtechnik immortalisiert und es entstand die murinen Hybridomzellen C72 [131]. Der C72 Antikörper ist somit eine krankheitsrelevanter Autoantikörper. In den Untersuchungen von Amital *et al.* konnte eine Reaktion des mAK C72 gegen das VRT101 Peptid im ELISA nachgewiesen werden [32]. Diese Ergebnisse konnten bei ELISA Untersuchungen mit dem nativen als auch denaturiertem hLAMA1-V3 Protein im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden (Abbildung 30A und 29C). Eine Homologie von 76% liegt zwischen den humanen und murinen Laminin DNA Sequenzen vor [202]. In Untersuchungen von hinsichtlich der Homologie zwischen murinem und humanen Lamininproteinbereich der LG4-5 wurde nur eine 41%ige Homologie auf der Proteinsequenzebene von Harrison *et al.* ermittelt [203]. Damit könnte begründet werden, dass keine Kreuzreaktivität des C72 mAk auf das humane hLAMA1-V3 Protein mit dem VRT101 Sequenz vorhanden ist.

Als weitere Möglichkeit eines zellulären Testsystems für die *in vitro*-Charakterisierung der humanen Laminin-basierten Fusionsproteine wurde die murine anti-Laminin Hybridomzelle AK8 verwendet [132]. In Analysen von Kondo *et al.* wurde die Reaktivität des AK8 Antikörpers mittels überlappenden Peptiden bzw. mithilfe von Phage Display identifiziert [132]. Bei dieser Studie wurden verschiedene Peptidsequenzen innerhalb der Laminin α 1-Kette als mögliche Epitope ermittelt. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Reaktivität des AK8 Antikörpers gegen die verschiedenen rekombinant hergestellten Lamininproteine (murin/human) mittels ELISA und Western Blot Analyse untersucht. In der Western Blot Analyse zeigt der AK8 Antikörper eine spezifische Reaktion auf das denaturierte rekombinante hLAMA1-V3 Protein (Abbildung 29, IV.3.3). Diese Antikörperbindung konnte in den ELISA Untersuchungen mit dem denaturiertem hLAMA1-V3 Protein nicht ermittelt werden. Daher war für die *in vitro*-Charakterisierung der humanen Laminin-basierten Fusionsproteine die AK8 Hybridomzelllinie nicht geeignet.

Im Gegensatz zu der hLAMA1-V3 Proteinvariante konnten die hLAMA1-V4 bzw. hLAMA1-G5 Proteinvarianten nur in sehr geringen Proteinausbeuten (0,3 - 0,4 mg/l) in *E.coli* Rosetta™ 2 (DE3) Zellen produziert und nachfolgend gereinigt werden (Abbildung 25, Tabelle 13). Aufgrund dessen ist eine Charakterisierung dieser Proteine in den Vorstudien schwierig gewesen. Die Expression von humanen Proteinen unterliegt in prokaryotischen Expressionssystemen vielen Schwierigkeiten, wie fehlende Proteinfaltung und -modifikation. Entsprechende Schwierigkeiten können durch Optimierungsarbeiten hinsichtlich der Expressionsbedingungen (z.B. Verringerung der

Stoffwechselaktivität durch Herabsetzen der Expressionstemperatur, Co-Expression von Stabilisierungsfaktoren / Chaperonen oder die Auswahl eines anderen Affinitäts-Tag zur gleichzeitigen Löslichkeitsstabilisierung) positiv beeinflusst werden [148, 150]. Eine Maßnahme, die im Rahmen dieser Arbeit verfolgt wurde, ist die Verwendung eines alternativen *E. coli* Expressionsstammes (Rosetta™ 2 DE3). Die Laminin α 1-Kette ist durch seine β -Faltblätter und den daraus resultierenden β -Sandwich-Strukturen der jeweiligen LG Domänen ein komplexes Protein. Während der *E. coli* Expression kann es daher zur Störung innerhalb der Proteinfaltungsprozesses kommen, sodass das hLAm1-V4 bzw. hLama1-G5 Protein nicht in löslicher Form im Periplasma transportiert wurde, sondern aggregiert im Zytosol vorliegt. Während der Expressionsuntersuchungen wurden das hLAMA1-V4 bzw. hLAMAa1-G5 Protein ebenfalls im Zellpellet nach Zellaufschluss im WB dokumentiert (Daten nicht gezeigt). Durch die Verwendung weiterer *E. coli* Expressionsstämme (Lemo21 DE3, ArticExpress DE3) konnte keine Verbesserung der Expressionsrate der humanen Laminin-Proteinvarianten erzeugt werden, um nachfolgende Experimente ohne Verunreinigungen durchzuführen. Neben den *E. coli* Zellen sind auch Hefen, wie *Pichia pastori* oder *Hansenula polymorpha* für die Expression von humanen Lamininprotein eher ungeeignet, da die Hypermannosylierungen an den Glycosilierungsstellen innerhalb der Laminin α 1-Kette entfernt werden müssten [204]. Für die Expression des hLAMAa1-V6 Protein wurde daher das eukaryotische Expressionssystem, hier transfizierte HEK 293T Zellen verwendet, um die beschriebenen Probleme bei der prokaryotischen Expression zu vermeiden. Leider konnte auch mit diesem Expressionssystem kein lösliches hLAMAa1-V6 Protein gewonnen werden. Als alternatives Expressionssystem für diese humanen Laminin-Fusionsproteine als therapeutische Proteine könnten CHO („chinese hamster ovary“) Zellen verwendet werden [151, 205, 206].

Aufgrund des Umstandes, dass das hLAMAa1-V6 Protein mit den hier verwendeten Expressionssystemen nicht erfolgreich hergestellt werden konnte, wurde für erste Vorstudien mit SLE-Patienten Seren und Urinproben ein kommerzielles rekombinantes hLAMAa1 Protein, mit der gleichen Sequenzlänge inklusive Histidin-Affinitätstag wie die hLAMAa1-V6 Lamininproteinvariante eingesetzt. Diese Variante umfasst eine Aminosäuresequenz aus der LG3 und LG4 Domäne der α 1-Kette (Abbildung 24), jedoch nicht die bekannte Epitop-Variante VRT101. In den ELISA Untersuchungen wurden Reaktionen auf diese hLAMAa1-V6 Proteinvariante bei SLE-Patienten mit Nephritis in Remission (NR) und aktiver Erkrankung ohne Nierenbeteiligung (S), jedoch nicht bei Patienten mit aktiver Nephritis (NS) im Vergleich zu gesunden Kontrollspendern nachgewiesen (Abbildung 26A, IV.3.2). In den untersuchten Urinproben der SLE Patienten zeigt sich jedoch ein anderes Bild: Die ELISA Analysen dokumentierten signifikante Autoantikörperreaktionen gegenüber dem hLAMAa1-V6 Protein bei Patienten mit aktiver Nephritis (Abbildung 26B). Aktive Nephritis ist gekennzeichnet durch Proteinurie, sodass die Autoantikörper und auch Immunkomplexe über die gestörten Nierenfunktionen ausgeschieden werden und daher im peripheren Blut kaum nachweisbar sind. Die ermittelten Daten werden durch Untersuchungsergebnisse von Ben-Yehuda *et al.* gestützt, die

ebenfalls α -Laminin-Autoantikörper bei SLE Patienten in Urinproben nachweisen konnten [29]. Diese Daten lassen die Frage nach der Detektion von anti-Laminin bzw. anderen anti-Membran-Ak unabhängig von der Krankheitsaktivität offen, wie es auch Seret *et al.* bei ihren Untersuchungen von α -Actinin-Ak im Serum bei LN-Patienten nicht klären konnten [207].

Hiermit erhalten wir erste Hinweise auf mögliche Epitop-Bereiche innerhalb der α 1-Kette des Laminins, die nicht auf lineare Peptidsequenzen beruhen. Alle vorangegangenen Analysen zu α -Laminin Autoantikörpern wurden jeweils nur mit Peptiden durchgeführt [32, 40, 132, 208], sodass die Dokumentation der Autoantikörper Reaktionen auf lineare Epitope erfolgte. Es stellt sich jedoch die Frage, ob solche linearen Epitope der Laminin α 1-Kette in den betroffenen Glomeruli während eines Krankheitsschubes auftreten und eine Bindung von kreuzreaktiven anti-DNA-Autoantikörpern oder direkte anti-Laminin Ak an diese Epitope hervorrufen können. Anzumerken ist jedoch, dass bei diesen ELISA Untersuchungen kein Kontrollprotein, wie z.B. ein in *E. coli* hergestelltes rekombinantes Protein mit His-tag, verwendet wurde. Daher kann in diesem Fall zunächst eine mögliche Reaktion von Antikörpern auf den vorhandenen Affinitätstag des rekombinanten Proteins nicht eindeutig ausgeschlossen werden.

V.2.2 Herstellung und Charakterisierung von murinen Laminin α 1-Proteinvarianten

Die murinen Laminin Proteinvarianten zeigten sich weniger aufwendig in der Herstellung insbesondere unter Verwendung der HEK 293T Zellen, sodass die Proteine mLAMA1-V4 und mLAMA1-G5 in löslicher Form gereinigt werden konnten (Abbildung 27). Die mLAMA1-G5 Proteinausbeute mit 3,4 mg/l liegt im vergleichbaren Produktionsrahmen wie z.B. die Expression der Laminin α 5-Kette mit 1 mg/l Proteinausbeute, welches ebenfalls in transfizierten HEK 293 Zellen exprimiert wurde [209]. Verschiedene Expressionen von murinen Laminin-Proteinvarianten (α 1LG4-5, α 4LG1-3, α 4LG4-5) wurden in transfizierten HEK293-EBNA Zellen in Serum-freiem Medium mit einer Proteinausbeute von 1-2 mg/l [210-212] oder in CHO-DG44 Zellen mit einer Proteinausbeute von 6 mg/l [213] durchgeführt. Diese Daten zeigen, dass die Produktion von murinem Lamininproteine gegenüber der humanen Proteinvarianten ohne größere Schwierigkeiten herstellbar sind. Im Gegensatz zu diesen Proteinvarianten, konnte das mLAMA1-V6 Protein nicht als lösliches Protein mit transfizierten HEK 293T Zellen hergestellt werden. Hierfür könnte eine mögliche Bindung bzw. Quervernetzung des Proteins an die extrazelluläre Matrixproteine der HEK 293T Zellen die Ursache sein. Die Laminin globulären Domänen weisen einige Bindungssequenzen zu z.B. Syndekan, Integrin und α -Dystroglykan auf [37, 214]. Eine andere Möglichkeit ist die Proteinfaltung und der niedrige isoelektrische Punkt (pI 5,5) des mLAMA1-V6 Proteins, sodass der Transport durch die Zellmembran aufgrund der Ladung behindert wird. Die erhoffte Verbesserung der Expression durch die Fusion des mLAMA1-V6 Proteins an den SNAP-tag ermöglichte jedoch auch keine Expression des Proteins in löslicher Form in den Zellkulturüberstand der transfizierten HEK 293T Zellen (Abbildung 28, IV.3.3). Eine intrazelluläre Expression des mLAMA1-V6-SNAP Proteins konnte in der Western

entfernt werden. Epratuzumab erzielt dadurch inhibitorische Effekte auf CD27⁻ naiven B-Zellen sowie auf CD27⁺ Gedächtnis-B-Zellen [15]. Allerdings verfehlte auch dieser monoklonale Antikörper in den Phase III-Studien die primären Endpunkte.

Belimumab ist ein humaner monoklonaler IgG1-Antikörper, der die lösliche Form des B-Lymphozyten-stimulierender Faktors BLYS/BAFF bindet und dessen Aktivität inhibiert [15, 18, 62]. BLYS ist ein zentrales Zytokin, welches für das Überleben, die Proliferation, die Aktivierung und Reifung von B-Zellen eine Rolle spielt und zur Tumor-Nekrose (TNF)-Familie gehört [18]. Belimumab ist 2011 für die Behandlung therapierefraktärer SLE-Patienten mit Hinweisen für eine serologische Aktivität von der FDA und der Europäischen Arzneimittelagentur (EMA) zugelassen worden. Vorteile der Therapie mit Belimumab sind insbesondere die Verhinderung schwerer Schübe unter gleichzeitiger Einsparung von Glykokortikoiden und die damit einhergehende langfristige gute Verträglichkeit [63], da eine längere Verabreichung von Glykokortikoiden mit erhöhten Nebenwirkungsrate und gleichzeitiger erhöhter Mortalität verbunden ist. Zurzeit wird eine klinische Studie mit Belimumab (BLISS-LN) an Lupusnephritis Patienten durchgeführt [17]. Gleichzeitig wird auch eine Kombinationstherapie mit initialer Rituximab-Verabreichung und anschließender Belimumab-Gabe in klinischen Studien getestet [18, 64]. Im Gegensatz zu Belimumab erreichte Tabalumab, ein humanisierter mAk gegen die lösliche und membrangebundene Form des BLYS, nicht die primären Endpunkte in der klinischen Phase II Studie [64].

Neben den beschriebenen monoklonalen Antikörpern werden auch bereits rekombinante Fusionsproteine, wie das Blisibimod (A-623) in klinischen Studien analysiert. Blisibimod besteht aus dem Fc-Teil des IgG Antikörpers und vier BAFF-Bindungsdomänen (Peptide), welche selektiv an BLYS binden [64]. Eine Phase II/III-Studie an SLE-Patienten mit mittlerem bis schwerem Erkrankungsgrad wird aktuell durchgeführt. Eine reduzierte Proteinurie, eine gestiegene Anzahl an B-Zellen sowie eine Wiederherstellung des Serumlevels des Komplementfaktors C3 und eine Verminderung des ds-DNA Antikörpertiters konnten bereits beobachtet werden [48].

Atacicept ist ein rekombinantes Fusionsprotein bestehend aus einem Teil des TACI-Rezeptors, welcher an BLYS und APRIL („a proliferation-inducing ligand“, B-Zellüberlebensfaktor) bindet, fusioniert mit einem Fc-Teil des IgG Antikörpers. Durch die Blockierung der Rezeptoren von BLYS und APRIL wird die Interaktion dieser proliferationsfördernden Substanzen inhibiert. Somit blockiert Atacicept die B-Zell-Reifung hin zu Plasmazellen und das Überleben [18]. Dadurch kommt es zur Verminderung der peripheren B-Zellen und zum relativen Anstieg der Gedächtnis-B-Zellen, ähnlich wie bei Belimumab.

Die positiven Ergebnisse der Blisibimod Studien und die Zulassung von Belimumab zeigen, dass das Konzept der B-Zell-gerichteten Therapien erfolgreiche Ansätze zur Behandlung von SLE-Patienten bieten kann. Die starke Heterogenität der Patienten sowie der aus ethischen Gründen gewählte kombinierte Einsatz etablierter und experimenteller Substanzen erschwert jedoch das Sichtbarwerden

nachgewiesen werden (Tabelle 14), obwohl routinemäßig die Oberflächenexpression der Antikörper überprüft wurde. Somit war es nicht möglich, die zytotoxische Aktivität der mLAMa1-G5-ETA' bzw. des mLAMa1-V6-ETA' Proteine nachzuweisen.

Als Alternative zu den murinen Hybridomzellen, wurde das K14-CD40L tg Mausmodell [41] auf Tauglichkeit für weiterführende Untersuchungen überprüft. Um zu untersuchen, ob sich das Mausmodell der CD40L-induzierten, SLE-ähnlichen Autoimmunität zur Charakterisierung von Laminin-spezifischen B-Zellen eignet und ob Laminin als Zielantigen für eine selektive Depletion autoreaktiver B-Zellen beim SLE verwendet werden kann, wurde zunächst das Vorhandensein von anti-Laminin-Antikörper im Serum sowie im Urin von K14-CD40L tg Mäusen im Vergleich zu den Seren von Wildtyp-Kontrolltieren bestimmt. Hierfür wurden ELISA Untersuchungen mit Mausseren und Urinproben durchgeführt. Bei diesen Untersuchungen mit einem kommerziell erhältlichen mLAMa1 Peptid (V6, AS 2640-2773) konnten erhöhte mLAMa1-Titer in den Seren, jedoch besonders im Urin einiger Tiere nachgewiesen werden (Abbildung 31A). Bei weiteren ELISA-Untersuchungen unter Verwendung eines Kontrollproteins (TTC, III.2.8.2, IV.1.1) wurden bei 2 von 5 Mausseren Antikörper gegen das mLAMa1-V6 detektiert (Abbildung 31B). Bei der Ausbildung des SLE-ähnlichen Erkrankungsbildes der K14-CD40L tg Mäuse [41] kann ein inhomogenes Erkrankungsbild vorhanden sein, wie es auch bei SLE-Patienten vorkommt, sodass dies die unterschiedliche Antikörper-Expression gegenüber dem mLAMa1 Protein erklären würde. Bei der Ausbildung einer Autoimmunität kommt es zu einer vermehrten B-Zell-Aktivierung, sodass verschiedenste Antikörper produziert werden (Hypergammaglobulinämie) [2], welches die Entstehung von Antikörper, die das Kontrollprotein erkennen, begründen würde.

Der Technologietransfer auf ein humanes krankheitsrelevantes Autoantigen, der Laminin- α 1 Kette, konnte soweit erfolgreich durchgeführt werden, sodass erste ETA'-basierte Fusionsproteine und entsprechende Kontrollproteine (ohne Effektor-domäne) aus der Laminin- α 1 Kette, für *in vitro*- und *ex vivo*-Eliminierungsstudien zur Verfügung stehen. Bei ersten Untersuchungen mit SLE-Patientenmaterial und dem K14-CD40L tg Mausmodell wurden Hinweise auf neue Epitopbereiche von Autoantikörpern innerhalb des AS-Sequenzbereichs 2640-2773 der Laminin α 1-Kette ermittelt.

V.3 Ausblick

Die notwendigen Voraussetzungen für die Wirksamkeit des Modell-Autoimmuntoxins, wie spezifische Zellbindung und Internalisierung wurden mittels dem SNAP-Fusionsprotein *in vitro* an den Tetanus-reaktiven Hybridomzellen 5E4 nachgewiesen. Weiterhin wurde die spezifische und konzentrationsabhängige Toxizität des TTC-ETA' Proteins charakterisiert. Somit wurde die Hypothese der zielgerichteten Eliminierung autoreaktiver B-Zellen mittels Antigen-spezifischer Fusionsproteine für das Modellantigen TTC erfolgreich mit einem ETA'-basierten Fusionsprotein auf humanen Tetanus-reaktiven Gedächtnis-B-Zellen bestätigt. Bei der Weiterentwicklung von zytotoxischen Antigen-basierten Fusionsproteinen mit humane Effektor-domäne konnte das GrB(R201K)-TTC

Fusionsprotein erfolgreich generiert und *in vitro* auf der humanen TTC-reaktiven B-Zelllinie analysiert werden. Die GrB(R201K) Effektordomäne kann anhand dieser Ergebnisse als möglicher neuer Kandidat für humane Antigen-basierter Fusionsproteine eingesetzt werden. Zur Verbesserung der zytotoxischen Aktivität des GrB(R201K)-TTC Proteins können verschiedene Ansätze zur Verbesserung der endosomalen Freisetzung angestrebt werden, wie im Abschnitt V.1.2 bereits diskutiert wurden. Um die klinische Entwicklung der humanen Antigen-spezifischen Fusionsproteine voranzutreiben sollten im nächsten Schritt die toxische Effizienz des GrB-TTC Fusionsprotein *ex vivo* auf Tetanustoxin-reaktive Gedächtnis-B-Zellen mittels ELISpot Analysen, wie es bei dem Modell-Autoimmuntoxin durchgeführt wurden, analysiert werden. Dabei sollte auch die optimale eliminierende Konzentration des GrB(R201K)-TTC Fusionsproteins ermittelt werden. Anschließend können *in vivo*-Studien mit humanisierten Mausmodellen, bei denen nach Zerstörung der Mauseigenen Immunzellen humane Immunzellen eingebracht wurden [216], durchgeführt werden. Dafür ist nach Einbringung der humanen Immunzellen eine Immunisierung der Versuchsmäuse gegen das Tetanustoxin zur Erzeugung von TTC-Gedächtnis-B-Zellen notwendig. Nach erfolgreich nachgewiesener Immunisierung mittels ELISA-Analysen können dann die Studien zur Verweildauer, spezifischer Lokalisierung in bestimmten Organen sowie Bestimmung der maximal-tolerierbarer Dosis (MTD) der rekombinanten Fusionsproteine durchgeführt werden.

Nachdem der Technologietransfer auf ein potentielles Autoantigen, der Laminin $\alpha 1$ -Kette bzw. deren Autoantigenfragmente erfolgte, stehen in diesem Bereich die vollständige Charakterisierung der Autoantigen-basierten Fusionsproteine hinsichtlich spezifischer Zellbindung an LAMa1-reaktive Gedächtnis-B-Zellen, sowie der Internalisierungs- und Toxizitätsnachweis noch aus. Da das K14-CD40L tg Mausmodell in den Voruntersuchungen erste positive Reaktionen hinsichtlich des Vorhandenseins von anti-mLAMa1-V6 Autoantikörpern nach Krankheitsausprägung gezeigt hat, könnte dieses Mausmodell für die Charakterisierung des Autoimmuntoxins mLAMa1-V6-ETA' herangezogen werden. In diesen weiterführenden Analysen sollte das Zellbindungsverhalten, sowie die Zytotoxizität der mLAMa1-V6 bzw. mLAMa1-V6-ETA' Proteins *ex vivo* auf isolierten B-Lymphozyten aus der Milz und Lymphknoten der CD40L tg Mäuse mit den gleichen Methoden wie beim Modell-Autoimmuntoxin charakterisiert werden. Da dieses Mausmodell erst nach einigen Wochen die SLE-ähnlichen Symptome ausbildet [43], sind Untersuchungen hinsichtlich des Auftretens der anti-Laminin Antikörper zu verschiedenen Zeitpunkten (vor, während, nach Manifestation des Krankheitsbildes) und aus unterschiedlichen Organen wie der Milz, Blut, und den drainierenden Lymphknoten interessant. Durch Lokalisationsstudien der Antikörper-sezernierenden Zellen mittels immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen könnte die Frage geklärt werden, ob die anti-Laminin Antikörper-produzierenden Zellen in sekundären lymphatischen Organe ausdifferenzieren und erst dann in entzündete Gewebe migrieren oder ob diese direkt im entzündlichen Gewebe in keimzentrumsähnlichen Strukturen heranreifen. Die SNAP-tag Technologie bietet einen hervorragende Möglichkeit die Lokalisation nicht nur an Gewebeschnitten, sondern auch gezielt *in*

in vivo über ein Antigen-SNAP Fusionsprotein, welches mit BG-modifizierten Farbstoffen gekoppelt ist, zu untersuchen [217, 218]. Jedoch muss das Problem der Eigenfluoreszenz des Fells der K14-CD40L tg Mäuse mit Bedacht werden [219]. Des Weiteren kann das K14-CD40L tg Mausmodell für *in vivo*-Studien zur Bestimmung der maximal tolerierbaren Dosis des Autoimmuntoxins und für Eliminierungsstudien mit Fokus auf den Krankheitsverlauf herangezogen werden. Es stellt sich jedoch die Frage, ob die Eliminierung einer Population an krankheitsrelevanten autoreaktiven Gedächtnis-B-Zellen für die Minimierung von Entzündungsprozessen in den Organen ausreicht, da SLE-Patienten und auch entsprechende Lupus-Mausmodelle eine Vielzahl von unterschiedlichen Autoantikörpern mit unterschiedlicher Wirkung auf das Krankungsbild aufweisen [2, 3, 9, 20, 220]. Daher wäre eine Kombinationsmöglichkeit innerhalb von bispezifischen zytotoxischen Fusionsproteinen mit mehr als einem Autoantigenfragment als Zellbindungsdomäne zur Eliminierung von mindestens zwei autoreaktiven Gedächtnis-B-Zellpopulationen eine neue und interessante Herangehensweise für die Antigen-spezifische Therapiestrategie. Hierfür könnten Autoantigen aus dem Bereich der gut charakterisierten anti-nuklearen Antigene, wie dem Smith (Sm)-Peptid oder dsDNA [3, 48, 221] als zweite Zellbindungseinheit herangezogen werden.

VI Literaturverzeichnis

1. Deane, K.D. and El-Gabalawy, H., **Pathogenesis and prevention of rheumatic disease: focus on preclinical RA and SLE.** *Nat Rev Rheumatol*, 2014. **10**(4): p. 212-228.
2. Davidson, A. and Diamond, B., **Autoimmune diseases.** *N Engl J Med*, 2001. **345**(5): p. 340-350.
3. Dema, B. and Charles, N., **Autoantibodies in SLE: specificities, isotypes and receptors.** *Antibodies*, 2016. **5**(1): p. e1-30.
4. Ahijon Lana, M., Fattah, Z. Fernandez SA, Isenberg, DA, **Systemic lupus erythematosus: direct B-cell blocking**, in *Drugs Targeting B-Cells in Autoimmune Diseases, Series: Milestones in Drug Therapy*, M. Parnham, Bruinvels, J., Editor 2014, *Springer Basel*: 65-78.
5. Ghodke-Puranik, Y. and Niewold, T.B., **Immunogenetics of systemic lupus erythematosus: A comprehensive review.** *J Autoimmun*, 2015. **64**: p. 125-136.
6. Hampe, C.S., **B Cells in Autoimmune Diseases.** *Scientifica*, 2012. **2012**: p. e1-18.
7. Ching, K.H., Burbelo, P.D., Tipton, C., Wei, C.W., Petri, M., Sanz, I. and Iadarola, M.J., **Two major autoantibody clusters in systemic lupus erythematosus.** *Plos One*, 2012. **7**(2): p. e1-11.
8. Rahman, A. and Isenberg, D.A., **Systemic lupus erythematosus.** *N Engl J Med*, 2008. **358**(9): p. 929-939.
9. Jacob, N. and Stohl, W., **Autoantibody-dependent and autoantibody-independent roles for B cells in systemic lupus erythematosus: past, present, and future.** *Autoimmunity*, 2010. **43**(1): p. 84-97.
10. Anolik, J.H., **B cell biology and dysfunction in SLE.** *Bull NYU Hosp Jt Dis*, 2007. **65**(3): p. 182-186.
11. Sang, A., Zheng, Y.Y. and Morel, L., **Contributions of B cells to lupus pathogenesis.** *Mol Immunol*, 2014. **62**(2): p. 329-338.
12. Yurasov, S., Wardemann, H., Hammersen, J., Tsuiji, M., Meffre, E., Pascual, V. and Nussenzweig, M.C., **Defective B cell tolerance checkpoints in systemic lupus erythematosus.** *J Exp Med*, 2005. **201**(5): p. 703-711.
13. Wardemann, H., Yurasov, S., Schaefer, A., Young, J.W., Meffre, E. and Nussenzweig, M.C., **Predominant autoantibody production by early human B cell precursors.** *Science*, 2003. **301**(5638): p. 1374-1377.
14. Shlomchik, M.J., Craft, J.E. and Mamula, M.J., **From T to B and back again: positive feedback in systemic autoimmune disease.** *Nat Rev Immunol*, 2001. **1**(2): p. 147-153.
15. Dorner, T., Shock, A., Goldenberg, D.M. and Lipsky, P.E., **The mechanistic impact of CD22 engagement with epratuzumab on B cell function: Implications for the treatment of systemic lupus erythematosus.** *Autoimmun Rev*, 2015. **14**(12): p. 1079-1086.
16. Bongu, A., Chang, E. and Ramsey-Goldman, R., **Can morbidity and mortality of SLE be improved?** *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2002. **16**(2): p. 313-332.
17. Parikh, S.V. and Rovin, B.H., **Current and emerging therapies for lupus nephritis.** *J Am Soc Nephrol*, 2016: p. e1-11.
18. Hoyer, B.F. and Dorner, T., **Biologics therapy for systemic lupus erythematosus. Current situation.** *Z Rheumatol*, 2015. **74**(3): p. 206-214.
19. Isenberg, D.A. and Rahman, A., **Systemic lupus erythematosus - Reply.** *N Engl J Med*, 2008. **358**(22): p. 2413-2413.
20. Yung, S. and Chan, T.M., **Autoantibodies and resident renal cells in the pathogenesis of lupus nephritis: getting to know the unknown.** *Clin Dev Immunol*, 2012: p. e1-13.
21. Kootstra, C.J., Bergijk, E.C., Veninga, A., Prins, F.A., de Heer, E., Abrahamson, D.R. and Bruijn, J.A., **Qualitative alterations in laminin expression in experimental lupus nephritis.** *Am J Pathol*, 1995. **147**(2): p. 476-488.
22. Peutz-Kootstra, C.J., Hansen, K., De Heer, E., Abrass, C.K. and Bruijn, J.A., **Differential expression of laminin chains and anti-laminin autoantibodies in experimental lupus nephritis.** *J Pathol*, 2000. **192**(3): p. 404-412.
23. Becker-Merok, A., Kalaaji, M., Haugbro, K., Nikolaisen, C., Nilsen, K., Rekvig, O.P. and Nossent, J.C., **Alpha-actinin-binding antibodies in relation to systemic lupus erythematosus and lupus nephritis.** *Arthritis Res Ther*, 2006. **8**(6): p. e1-8.
24. Hanrotel-Saliou, C., Segalen, I., Le Meur, Y., Youinou, P. and Renaudineau, Y., **Glomerular antibodies in lupus nephritis.** *Clin Rev Allergy Immunol*, 2011. **40**(3): p. 151-158.
25. Mjelle, J.E., Rekvig, O.P., Van Der Vlag, J. and Fenton, K.A., **Nephritogenic antibodies bind in glomeruli through interaction with exposed chromatin fragments and not with renal cross-reactive antigens.** *Autoimmunity*, 2011. **44**(5): p. 373-383.
26. Olin, A.I., Morgelin, M., Truedsson, L., Sturfelt, G. and Bengtsson, A.A., **Pathogenic mechanisms in lupus nephritis: Nucleosomes bind aberrant laminin beta1 with high affinity and colocalize in the electron-dense deposits.** *Arthritis Rheumatol*, 2014. **66**(2): p. 397-406.

des Effektes B-Zell-beeinflussender Substanzen in klinischen Studien. Außerdem lösen auch diese Therapiestrategien nicht das Problem der nur eingeschränkten Erreichbarkeit autoreaktiver antigen-erfahrener B-Zellen.

I.4 Antigen-spezifische Eliminierung autoreaktiver B-Zellen

Eine alternative Variante als zielgerichteter Therapieansatz ist das spezifische Targeting und die Eliminierung autoreaktiver B-Zellen über ihren einzigartigen B-Zell-Rezeptor. Hierfür werden Fusionsprotein mit Zellbindedomäne, ein relevantes Peptidfragment des Autoantigens, und Effektor-domänen eingesetzt. Dieser Ansatz basiert auf der Verwendung von Immuntoxinen aus dem Bereich der Krebsdiagnostik und -therapie [65]. Dieses Konzept der zielgerichteten Therapie wurde schon von Paul Ehrlich in den frühen 1900er Jahren entwickelt [66, 67]. In den letzten Jahrzehnten wurde dieser Ansatz weiterentwickelt, sodass nun nicht nur monoklonale Antikörper als Zellbindedomäne eingesetzt werden, sondern auch Teilfragmente von monoklonalen Antikörpern wie variable Fragmente („single chain“ scFv), Antigen-Bindungsfragmente $F(ab)_2'$ oder Rezeptoren und Liganden [65, 67, 68]. Als zytotoxische Domäne innerhalb der Immuntoxine werden bakterielle Toxine, wie das *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A (ETA), Diphtheria Toxin A oder pflanzliche Toxine, wie das Rizin und Gelonin verwendet [67, 69]. Zunächst wurden bei Immuntoxinen die Zellbindungseinheiten mit der toxischen Domäne über chemische Kopplung wie z.B. Disulfidbrücken, Peptidbindungen oder Thioetherbindungen verbunden. Nach Weiterentwicklungen der Immuntoxine wurden die Verbindung der zwei Domänen nun rekombinant durch genetische Fusionen erreicht [70, 71]. Bei rekombinanten Immuntoxinen wird die Zellbindungsdomäne des bakteriellen Toxins, wie im Fall des ETAs (Domäne Ia und Ib) durch die gewünschten Antikörper-Fragmente oder anderen Liganden ersetzt [67, 71, 72]. Für die zielgerichtete Therapie mittels Immuntoxinen ist die Unterscheidung zwischen gesunder und krankhafter Zellen entscheidend, um unspezifische Toxizität an gesunden Zellen zu vermeiden. Bei der Verwendung des Prinzips der Immuntoxine für das zielgerichtete Targeting und die Eliminierung von B-Lymphozyten kann über die spezifische Bindung des Antigens an dem BZR eine effiziente Zellbindung erreicht werden.

Folgende Eigenschaften sollten effiziente Immuntoxine aufweisen: 1) spezifische Zellbindung an die Zielzellen, 2) schnelle Rezeptor-vermittelte Internalisierung und Transport über die Endosomen zum Golgi-Apparat hin zum endoplasmatischen Retikulum (ER), 3) Abspaltung und Freisetzung der toxischen Domäne aus dem ER ins Zytoplasma (Abbildung 3). ETA als toxische Domäne kann über zwei Wirkmechanismen Apoptose in den Zielzellen induzieren. Zum einen wird durch Adenosin 5'-Diphosphat die (ADP)-Ribosylierung des Elongationsfaktors 2 herbeigeführt, was zum Anhalten der Proteinsynthese und nachfolgend zur Apoptose der Zelle führt [67, 71, 73]. Zum anderen kann es auch über die Aktivierung von Caspasen, insbesondere der Caspase-3 die Spaltung des Reparaturenzyms poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) katalysieren und den programmierten Zelltod verursachen

49. Mamula, M.J., **B lymphocyte biology in SLE**, in *Systemic Lupus Erythematosus*, T.K. R.G. Lahita, J. Buyon, G. Tsokos, Editor 2010, *Elsevier* 143-162.
50. Jacobi, A.M., Odendahl, M., Reiter, K., Bruns, A., Burmester, G.R., Radbruch, A., Valet, G., Lipsky, P.E. and Dorner, T., **Correlation between circulating CD27(high) plasma cells and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus**. *Arthritis Rheum*, 2003. **48**(5): p. 1332-1342.
51. Dorner, T., Jacobi, A.M., Lee, J. and Lipsky, P.E., **Abnormalities of B cell subsets in patients with systemic lupus erythematosus**. *J Immunol Methods*, 2011. **363**(2): p. 187-197.
52. Jacobi, A.M., Mei, H., Hoyer, B.F., Mumtaz, I.M., Thiele, K., Radbruch, A., Burmester, G.R., Hiepe, F. and Dorner, T., **HLA-DRhigh/CD27(high) plasmablasts indicate active disease in patients with systemic lupus erythematosus**. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2010. **69**(1): p. 305-308.
53. Jacobi, A.M., Reiter, K., Mackay, M., Aranow, C., Hiepe, F., Radbruch, A., Hansen, A., Burmester, G.R., Diamond, B., Lipsky, P.E. and Dorner, T., **Activated memory B cell subsets correlate with disease activity in systemic lupus erythematosus - Delineation by expression of CD27, IgD, and CD95**. *Arthritis Rheum*, 2008. **58**(6): p. 1762-1773.
54. Odendahl, M., Jacobi, A., Hansen, A., Feist, E., Hiepe, F., Burmester, G.R., Lipsky, P.E., Radbruch, A. and Dorner, T., **Disturbed peripheral B lymphocyte homeostasis in systemic lupus erythematosus**. *J Immunol*, 2000. **165**(10): p. 5970-5979.
55. Wehr, C., Eibel, H., Masilamani, M., Illges, H., Schlesier, M., Peter, H.H. and Warnatz, K., **A new CD21(low) B cell population in the peripheral blood of patients with SLE**. *Clin Immunol*, 2004. **113**(2): p. 161-171.
56. Manson, J.J. and Rahman, A., **Systemic lupus erythematosus**. *Orphanet J Rare Dis*, 2006. **1**: p. 6.
57. Rainsford, K.D., Parke, A.L., Clifford-Rashotte, M. and Kean, W.F., **Therapy and pharmacological properties of hydroxychloroquine and chloroquine in treatment of systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and related diseases**. *Inflammopharmacology*, 2015. **23**(5): p. 231-269.
58. Mirabelli, G., Cannarile, F., Bruni, C., Vagelli, R., De Luca, R. and Carli, L., **One year in review 2015: systemic lupus erythematosus**. *Clin Exp Rheumatol*, 2015. **33**(3): p. 414-425.
59. Yildirim-Toruner, C. and Diamond, B., **Current and novel therapeutics in the treatment of systemic lupus erythematosus**. *J Allergy Clin Immunol Pract*, 2011. **127**(2): p. 303-312.
60. Kamen, D.L. and Zollars, E.S., **Corticosteroids in lupus nephritis and central nervous system lupus**. *Rheumatic Disease Clinics of North America*, 2016. **42**(1): p. 63-73.
61. Dorner, T., Jacobi, A.M. and Lipsky, P.E., **B cells in autoimmunity**. *Arthritis Research & Therapy*, 2009. **11**(5).
62. Chan, A.C. and Carter, P.J., **Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation**. *Nat Rev Immunol*, 2010. **10**(5): p. 301-316.
63. Jacobi, A.M., Huang, W.Q., Wang, T., Freimuth, W., Sanz, I., Furie, R., Mackay, M., Aranow, C., Diamond, B. and Davidson, A., **Effect of long-term belimumab treatment on B cells in systemic lupus erythematosus**. *Arthritis and Rheumatism*, 2010. **62**(1): p. 201-210.
64. Sciascia, S., Talavera-Garcia, E., Roccatello, D., Baldovino, S., Mengatti, E. and Cuadrado, M.J., **Upcoming biological therapies in systemic lupus erythematosus**. *Int Immunopharmacol*, 2015. **27**(2): p. 189-193.
65. Fitzgerald, D., Kreitman, R.J. and Pastan, I., **Recombinant immunotoxins for cancer-treatment**. *Exp Hematol*, 1993. **21**(8): p. 1012-1012.
66. Mathew, M. and Verma, R.S., **Humanized immunotoxins: a new generation of immunotoxins for targeted cancer therapy**. *Cancer Sci*, 2009. **100**(8): p. 1359-1365.
67. Pastan, I., Hassan, R., Fitzgerald, D.J. and Kreitman, R.J., **Immunotoxin therapy of cancer**. *Nat Rev Cancer*, 2006. **6**(7): p. 559-565.
68. Pastan, I., Hassan, R., FitzGerald, D.J. and Kreitman, R.J., **Immunotoxin treatment of cancer**. *Annu Rev Med*, 2007. **58**: p. 221-237.
69. Wawrzynczak, E.J., **Systemic immunotoxin therapy of cancer - advances and prospects**. *Br J Cancer*, 1991. **64**(4): p. 624-630.
70. Alewine, C., Hassan, R. and Pastan, I., **Advances in anticancer immunotoxin therapy**. *Oncologist*, 2015. **20**(2): p. 176-185.
71. Kreitman, R.J., **Recombinant immunotoxins containing truncated bacterial toxins for the treatment of hematologic malignancies**. *BioDrugs*, 2009. **23**(1): p. 1-13.
72. Matthey, B., Engert, A., Klimka, A., Diehl, V. and Barth, S., **A new series of pET-derived vectors for high efficiency expression of Pseudomonas exotoxin-based fusion proteins**. *Gene*, 1999. **229**(1-2): p. 145-153.
73. Du, X., Xiang, L., Mackall, C. and Pastan, I., **Killing of resistant cancer cells with low Bak by a combination of an antimesothelin immunotoxin and a TRAIL Receptor 2 agonist antibody**. *Clin Cancer Res*, 2011. **17**(18): p. 5926-5934.

74. Nicholson, D.W. and Thornberry, N.A., **Caspases: killer proteases.** *Trends Biochem Sci*, 1997. **22**(8): p. 299-306.
75. Houchins, J.P., **Immunotoxin-induced apoptosis.** *Stem Cells*, 2000. **18**(5): p. 384-385.
76. Weidle, U.H., Tiefenthaler, G., Schiller, C., Weiss, E.H., Georges, G. and Brinkmann, U., **Prospects of bacterial and plant protein-based immunotoxins for treatment of cancer.** *Cancer Genomics Proteomics*, 2014. **11**(1): p. 25-38.
77. Nachreiner, T., **Antigen-specific depletion of autoreactive B lymphocytes in multiple sclerosis.** 2009, *RWTH University, Aachen*.
78. Wayne, A.S., Fitzgerald, D.J., Kreitman, R.J. and Pastan, I., **Immunotoxins for leukemia.** *Blood*, 2014. **123**(16): p. 2470-2477.
79. Kreitman, R.J., Stetler-Stevenson, M., Jaffe, E.S., Conlon, K.C., Steinberg, S.M., Wilson, W., Waldmann, T.A. and Pastan, I., **Complete remissions of adult T-cell leukemia with anti-CD25 recombinant immunotoxin LMB-2 and chemotherapy to block immunogenicity.** *Clin Cancer Res*, 2016. **22**(2): p. 310-318.
80. Mazor, R., Vassall, A.N., Eberle, J.A., Beers, R., Weldon, J.E., Venzon, D.J., Tsang, K.Y., Benhar, I. and Pastan, I., **Identification and elimination of an immunodominant T-cell epitope in recombinant immunotoxins based on Pseudomonas exotoxin A.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(51): p. e3597-3603.
81. Liu, W.H., Onda, M., Lee, B., Kreitman, R.J., Hassan, R., Xiang, L.M. and Pastan, I., **Recombinant immunotoxin engineered for low immunogenicity and antigenicity by identifying and silencing human B-cell epitopes.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(29): p. 11782-11787.
82. Weldon, J.E. and Pastan, I., **A guide to taming a toxin--recombinant immunotoxins constructed from Pseudomonas exotoxin A for the treatment of cancer.** *FEBS J*, 2011. **278**(23): p. 4683-4700.
83. Hehmann-Titt, G., Schiffer, S., Berges, N., Melmer, G. and Barth, S., **Improving the therapeutic potential of human granzyme B for targeted cancer therapy.** *Antibodies*, 2013. **2**(1): p. 19-49.
84. Hristodorov, D., Mladenov, R., Pardo, A., Pham, A.T., Huhn, M., Fischer, R., Thepen, T. and Barth, S., **Microtubule-associated protein tau facilitates the targeted killing of proliferating cancer cells in vitro and in a xenograft mouse tumour model in vivo.** *Br J Cancer*, 2013. **109**(6): p. 1570-1578.
85. Schiffer, S., Hansen, H.P., Hehmann-Titt, G., Huhn, M., Fischer, R., Barth, S. and Thepen, T., **Efficacy of an adapted granzyme B-based anti-CD30 cytolytic fusion protein against PI-9-positive classical Hodgkin lymphoma cells in a murine model.** *Blood Cancer J*, 2013. **3**: p. e106-113.
86. Kurschus, F.C. and Jenne, D.E., **Delivery and therapeutic potential of human granzyme B.** *Immunol Rev*, 2010. **235**: p. 159-171.
87. Niesen, J., Stein, C., Brehm, H., Hehmann-Titt, G., Fendel, R., Melmer, G., Fischer, R. and Barth, S., **Novel EGFR-specific immunotoxins based on panitumumab and cetuximab show in vitro and ex vivo activity against different tumor entities.** *J Cancer Res Clin Oncol*, 2015. **141**(12): p. 2079-2095.
88. Weidle, U.H., Georges, G. and Brinkmann, U., **Fully human targeted cytotoxic fusion proteins: new anticancer agents on the horizon.** *Cancer Genomics Proteomics*, 2012. **9**(3): p. 119-133.
89. Barry, M., Heibein, J.A., Pinkoski, M.J., Lee, S.F., Moyer, R.W., Green, D.R. and Bleackley, R.C., **Granzyme B short-circuits the need for caspase 8 activity during granule-mediated cytotoxic T-lymphocyte killing by directly cleaving bid.** *Mol Cell Biol*, 2000. **20**(11): p. 3781-3794.
90. Heibein, J.A., Goping, I.S., Barry, M., Pinkoski, M.J., Shore, G.C., Green, D.R. and Bleackley, R.C., **Granzyme B-mediated cytochrome c release is regulated by the Bcl-2 family members Bid and Bax.** *J Exp Med*, 2000. **192**(10): p. 1391-1401.
91. Metkar, S.S., Wang, B., Ebbs, M.L., Kim, J.H., Lee, Y.J., Raja, S.M. and Froelich, C.J., **Granzyme B activates procaspase-3 which signals a mitochondrial amplification loop for maximal apoptosis.** *J Cell Bio*, 2003. **160**(6): p. 875-885.
92. Giesubel, U., Dalken, B., Mahmud, H. and Wels, W.S., **Cell binding, internalization and cytotoxic activity of human granzyme B expressed in the yeast Pichia pastoris.** *Biochem J*, 2006. **394**(Pt 3): p. 563-573.
93. Dalken, B., Giesubel, U., Knauer, S.K. and Wels, W.S., **Targeted induction of apoptosis by chimeric granzyme B fusion proteins carrying antibody and growth factor domains for cell recognition.** *Cell Death Differ*, 2006. **13**(4): p. 576-585.
94. Schiffer, S., Letzian, S., Jost, E., Mladenov, R., Hristodorov, D., Huhn, M., Fischer, R., Barth, S. and Thepen, T., **Granzyme M as a novel effector molecule for human cytolytic fusion proteins: CD64-specific cytotoxicity of Gm-H22(scFv) against leukemic cells.** *Cancer Lett*, 2013. **341**(2): p. 178-185.
95. Stahnke, B., Thepen, T., Stocker, M., Rosinke, R., Jost, E., Fischer, R., Tur, M.K. and Barth, S., **Granzyme B-H22(scFv), a human immunotoxin targeting CD64 in acute myeloid leukemia of monocytic subtypes.** *Mol Cancer Ther*, 2008. **7**(9): p. 2924-2932.
96. Losasso, V., Schiffer, S., Barth, S. and Carloni, P., **Design of human granzyme B variants resistant to serpin B9.** *Proteins*, 2012. **80**(11): p. 2514-2522.

97. Schiffer, S., Rosinke, R., Jost, E., Hehmann-Titt, G., Huhn, M., Melmer, G., Barth, S. and Thepen, T., **Targeted ex vivo reduction of CD64-positive monocytes in chronic myelomonocytic leukemia and acute myelomonocytic leukemia using human granzyme B-based cytolytic fusion proteins.** *Int J Cancer*, 2014. **135**(6): p. 1497-1508.
98. Giodini, A., Kallio, M.J., Wall, N.R., Gorbisky, G.J., Tognin, S., Marchisio, P.C., Symons, M. and Altieri, D.C., **Regulation of microtubule stability and mitotic progression by survivin.** *Cancer Res*, 2002. **62**(9): p. 2462-2467.
99. Ligon, L.A., Shelly, S.S., Tokito, M. and Holzbaur, E.L.F., **The microtubule plus-end proteins EB1 and dynactin have differential effects on microtubule polymerization.** *Mol Biol Cell*, 2003. **14**(4): p. 1405-1417.
100. Spittle, C., Charrasse, S., Larroque, C. and Cassimeris, L., **The interaction of TOGp with microtubules and tubulin.** *J Biol Chem*, 2000. **275**(27): p. 20748-20753.
101. Henriquez, J.P., Cross, D., Vial, C. and Maccioni, R.B., **Subpopulations of tau interact with microtubules and actin-filaments in various cell-types.** *Cell Biochem Funct*, 1995. **13**(4): p. 239-250.
102. Maccioni, R.B. and Cambiasso, V., **Role of Microtubule-associated proteins in the control of microtubule assembly.** *Physiol Rev*, 1995. **75**(4): p. 835-864.
103. Drechsel, D.N., Hyman, A.A., Cobb, M.H. and Kirschner, M.W., **Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein Tau.** *Mol Biol Cell*, 1992. **3**(10): p. 1141-1154.
104. Brehm, H., Hristodorov, D., Pardo, A., Mladenov, R., Niesen, J., Fischer, R., Tur, M.K. and Barth, S., **Targeted killing of rhabdomyosarcoma cells by a MAP-based human cytolytic fusion protein.** *Cancer Lett*, 2015. **365**(2): p. 149-155.
105. Hristodorov, D., Amoury, M., Mladenov, R., Niesen, J., Arens, K., Berges, N., Hein, L., Di Fiore, S., Pham, A.T., Huhn, M., Helfrich, W., Fischer, R., Thepen, T. and Barth, S., **EpCAM-selective elimination of carcinoma cells by a novel MAP-based cytolytic fusion protein.** *Mol Cancer Ther*, 2014. **13**(9): p. 2194-2202.
106. Amoury, M., Blume, T., Brehm, H., Niesen, J., Tenhaef, N., Barth, S., Gattenlohner, S., Helfrich, W., Fitting, J., Nachreiner, T. and Pardo, A., **SNAP-tag based agents for preclinical in vitro imaging in malignant diseases.** *Curr Pharm Des*, 2013. **19**(30): p. 5429-5436.
107. Hussain, A.F., Amoury, M. and Barth, S., **SNAP-tag technology: a powerful tool for site specific conjugation of therapeutic and imaging agents.** *Curr Pharm Des*, 2013. **19**(30): p. 5437-5442.
108. Kampmeier, F., Ribbert, M., Nachreiner, T., Dembski, S., Beaufils, F., Brecht, A. and Barth, S., **Site-specific, covalent labeling of recombinant antibody fragments via fusion to an engineered version of 6-O-alkylguanine DNA alkyltransferase.** *Bioconjug Chem*, 2009. **20**(5): p. 1010-1015.
109. Nachreiner, T., Kampmeier, F., Thepen, T., Fischer, R., Barth, S. and Stocker, M., **Depletion of autoreactive B-lymphocytes by a recombinant myelin oligodendrocyte glycoprotein-based immunotoxin.** *J Neuroimmunol*, 2008. **195**(1-2): p. 28-35.
110. Jacobi, A.M., Zhang, J., Mackay, M., Aranow, C. and Diamond, B., **Phenotypic characterization of autoreactive B Cells - Checkpoints of B cell tolerance in patients with systemic lupus erythematosus.** *Plos One*, 2009. **4**(6).
111. Fitzsimmons, S.P., Clark, K.C., Wilkerson, R. and Shapiro, M.A., **Inhibition of tetanus toxin fragment C binding to ganglioside G(T1b) by monoclonal antibodies recognizing different epitopes.** *Vaccine*, 2000. **19**(1): p. 114-121.
112. Eisel, U., Jarausch, W., Goretzki, K., Henschen, A., Engels, J., Weller, U., Hudel, M., Habermann, E. and Niemann, H., **Tetanus toxin: primary structure, expression in E. coli, and homology with botulinum toxins.** *EMBO J*, 1986. **5**(10): p. 2495-2502.
113. Calvo, A.C., Oliván, S., Manzano, R., Zaragoza, P., Aguilera, J. and Osta, R., **Fragment C of tetanus toxin: new insights into its neuronal signaling pathway.** *Int J Mol Sci*, 2012. **13**(6): p. 6883-6901.
114. Louch, H.A., Buczko, E.S., Woody, M.A., Venable, R.M. and Vann, W.F., **Identification of a binding site for ganglioside on the receptor binding domain of tetanus toxin.** *Biochemistry*, 2002. **41**(46): p. 13644-13652.
115. Rosenfeld, C., Goutner, A., Choquet, C., Venuat, A.M., Kayibanda, B., Pico, J.L. and Greaves, M.F., **Phenotypic characterization of a unique non-T, Non-B acute lymphoblastic leukemia cell line.** *Nature*, 1977. **267**(5614): p. 841-843.
116. Munoz-Lopez, M. and Garcia-Perez, J.L., **DNA transposons: nature and applications in genomics.** *Curr Genomics*, 2010. **11**(2): p. 115-128.
117. Skipper, K.A., Andersen, P.R., Sharma, N. and Mikkelsen, J.G., **DNA transposon-based gene vehicles - scenes from an evolutionary drive.** *J Biomed Sci*, 2013. **20**: p. e1-23.
118. Saha, S., Nakazawa, Y., Huye, L.E., Doherty, J.E., Galvan, D.L., Rooney, C.M. and Wilson, M.H., **piggyBac transposon system modification of primary human T cells.** *J Vis Exp*, 2012(69): p. e1-5.

119. Antoniou, M.N., Skipper, K.A. and Anakok, O., **Optimizing retroviral gene expression for effective therapies.** *Hum Gene Ther*, 2013. **24**(4): p. 363-374.
120. Di Matteo, M., Samara-Kuko, E., Ward, N.J., Waddington, S.N., McVey, J.H., Chuah, M.K. and VandenDriessche, T., **Hyperactive piggyBac transposons for sustained and robust liver-targeted gene therapy.** *Mol Ther*, 2014. **22**(9): p. 1614-1624.
121. Maiti, S.N., Huls, H., Singh, H., Dawson, M., Figliola, M., Olivares, S., Rao, P., Zhao, Y.J., Multani, A., Yang, G., Zhang, L., Crossland, D., Ang, S., Torikai, H., Rabinovich, B., Lee, D.A., Kebriaei, P., Hackett, P., Champlin, R.E. and Cooper, L.J., **Sleeping beauty system to redirect T-cell specificity for human applications.** *J Immunother*, 2013. **36**(2): p. 112-123.
122. Nakazawa, Y., Huye, L.E., Dotti, G., Foster, A.E., Vera, J.F., Manuri, P.R., June, C.H., Rooney, C.M. and Wilson, M.H., **Optimization of the PiggyBac transposon system for the sustained genetic modification of human T lymphocytes.** *J Immunother*, 2009. **32**(8): p. 826-836.
123. Saha, S., Woodard, L.E., Charron, E.M., Welch, R.C., Rooney, C.M. and Wilson, M.H., **Evaluating the potential for undesired genomic effects of the piggyBac transposon system in human cells.** *Nucleic Acids Res*, 2015. **43**(3): p. 1770-1782.
124. Yusa, K., Zhou, L., Li, M.A., Bradley, A. and Craig, N.L., **A hyperactive piggyBac transposase for mammalian applications.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(4): p. 1531-1536.
125. Waldmeier, L., Hellmann, I., Gutknecht, C.K., Wolter, F.I., Cook, S.C., Reddy, S.T., Grawunder, U. and Beerli, R.R., **Transpo-mAb display: Transposition-mediated B cell display and functional screening of full-length IgG antibody libraries.** *MAbs*, 2016: p. 1-15.
126. Grawunder, U., **Transposition-mediated identification of specific binding or functional proteins:** NBE-Therapeutics LLC, Inc. Basel (CH), 2014, 13177083.6, EP 2 687 599 A1
127. Sambrook JaR, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual.** 2001 *Cold Spring Harbour, New York*. p.
128. Stocker, M., Tur, M.K., Sasse, S., Krussmann, A., Barth, S. and Engert, A., **Secretion of functional anti-CD30-angiogenin immunotoxins into the supernatant of transfected 293T-cells.** *Protein Expr Purif*, 2003. **28**(2): p. 211-219.
129. Durocher, Y., Perret, S. and Kamen, A., **High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells.** *Nucleic Acids Research*, 2002. **30**(2): p. e1-9.
130. Lington, C., Bradl, M., Lassmann, H., Brunner, C. and Vass, K., **Augmentation of demyelination in rat acute allergic encephalomyelitis by circulating mouse monoclonal antibodies directed against a myelin/oligodendrocyte glycoprotein.** *Am J Pathol*, 1988. **130**(3): p. 443-454.
131. Eilat, D. and Fischel, R., **Recurrent utilization of genetic elements in V-Regions of antinucleic acid antibodies from autoimmune mice.** *J Immunol*, 1991. **147**(1): p. 361-368.
132. Kondo, A., Inagaki, J., Kobayashi, K., Tsukamoto, H., Yamamoto, D., Nakatsuka, M., Suzuki, N., Nomizu, M., Amano, S., Matsubayashi, H., Yasuda, T., Lopez, L.R., Shoenfeld, Y., Makino, T. and Matsuura, E., **Characterization of a murine anti-laminin-1 monoclonal antibody (AK8) produced by immunization with mouse-derived laminin-1.** *Clin Dev Immunol*, 2005. **12**(1): p. 67-73.
133. Bialon, M., Schellenberg, L., Herzog, N., Kraus, S., Jorissen, H., Fischer, R., Stein, C., Nahring, J., Barth, S. and Puttmann, C., **Cloning murine antibody V-genes with non-degenerate primers and conversion to a recombinant antibody format.** *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother*, 2014. **33**(6): p. 369-377.
134. Hanahan, D., **Studies on transformation of Escherichia-coli with plasmids.** *J Mol Bio*, 1983. **166**(4): p. 557-580.
135. Barth, S., Huhn, M., Matthey, B., Klimka, A., Galinski, E.A. and Engert, A., **Compatible-solute-supported periplasmic expression of functional recombinant proteins under stress conditions.** *Appl Environ Microbiol*, 2000. **66**(4): p. 1572-1579.
136. Laemmli, U.K., **Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4.** *Nature*, 1970. **227**(5259): p. 680-685.
137. Klose, D., Saunders, U., Barth, S., Fischer, R., Jacobi, A.M. and Nachreiner, T., **Novel fusion proteins for the antigen-specific staining and elimination of B cell receptor-positive cell populations demonstrated by a tetanus toxoid fragment C (TTC) model antigen.** *Bmc Biotechnology*, 2016. **16**.
138. Odegard, J.M., Marks, B.R., DiPlacido, L.D., Poholek, A.C., Kono, D.H., Dong, C., Flavell, R.A. and Craft, J., **ICOS-dependent extrafollicular helper T cells elicit IgG production via IL-21 in systemic autoimmunity.** *J Exp Med*, 2008. **205**(12): p. 2873-U2102.
139. Bernasconi, N.L., Traggiai, E. and Lanzavecchia, A., **Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells.** *Science*, 2002. **298**(5601): p. 2199-2202.
140. Hnasko, R., Lin, A., McGarvey, J.A. and Stanker, L.H., **A rapid method to improve protein detection by indirect ELISA.** *Biochem Biophys Res Commun*, 2011. **410**(4): p. 726-731.
141. Hampe, C.S., **B Cells in Autoimmune Diseases.** *Scientifica*, 2012. **2012**: p. 18.

[74, 75]. Für die Translokation der ETA-Domäne in das Zytosol der Zielzelle ist C-terminal die Aminosäure-Sequenz REDLK notwendig [76].

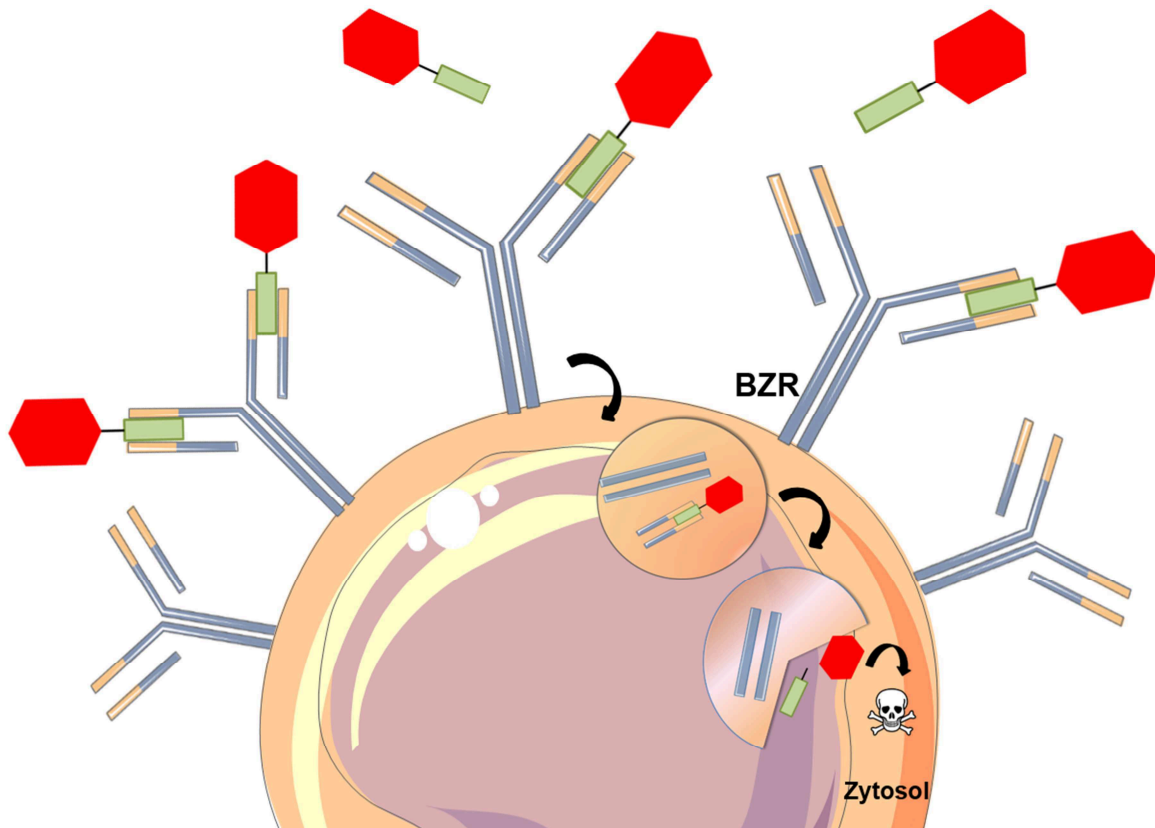


Abbildung 3: Antigen-spezifische Elimination autoreaktiver B-Zellen mit zytotoxisch wirksamen Fusionsproteinen.

1) Bindung des Antigen-basierten Fusionsproteins an den B-Zellrezeptor, 2) Rezeptor-vermittelte Internalisierung des Antigen-B-Zellrezeptor-Komplexes, 3) Freisetzung der zytotoxischen/zytolytischen Effektor-domäne ins Zytosol und 4) Hemmung der Proteinsynthese bzw. Auslösung der Apoptose. Abbildung wurde modifiziert nach [77].

Die ersten klinischen Studien mit auf ETA-basierenden Immuntoxinen sind bereits erfolgreich abgeschlossen worden. Moxetumomab, ein anti-CD22-(Fv) RFB4 Antikörper fusioniert mit einer modifizierten ETA Variante (PE38) zeigte erste Erfolge und befindet sich nun in einer Phase III Studie [78]. Das LMB-2, ein anti-Tac-Antikörper konjugiert mit einer modifizierten Variante des *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A wurde in einer klinischen Studie der Phase II zusammen mit einem Immunsuppressivum und Chemotherapeutikum (Cyclophosphamid, Fludarabine) verabreicht. Durch diese Kombination konnte eine vollständige Remission bei Patienten mit T-Zell Leukämie erreicht werden [79]. Jedoch weisen Immuntoxine basierend auf bakteriellen oder pflanzlichen Toxinen oder murinen mAk Fragmenten selbst eine Immunogenität auf, sodass Patienten nach den ersten ein bis zwei Medikamentengaben neutralisierende Antikörper bilden können. Weiterhin können die Immuntoxine in hohen Konzentrationen auch eine unspezifische Toxizität aufweisen [66, 71, 78]. Zur Verringerung der Immunogenität der Immuntoxine werden humane monoklonare Antikörper

163. Hua, Z. and Hou, B., **TLR signaling in B-cell development and activation.** *Cell Mol Immunol*, 2013. **10**(2): p. 103-106.
164. Xu, H., Liew, L.N., Kuo, I.C., Huang, C.H., Goh, D.L.M. and Chua, K.Y., **The modulatory effects of lipopolysaccharide-stimulated B cells on differential T-cell polarization.** *Immunology*, 2008. **125**(2): p. 218-228.
165. Stoddart, A., Jackson, A.P. and Brodsky, F.M., **Plasticity of B cell receptor internalization upon conditional depletion of clathrin.** *Mol Biol Cell*, 2005. **16**(5): p. 2339-2348.
166. Malhotra, S., Kovats, S., Zhang, W.G. and Coggeshall, K.M., **B Cell antigen receptor endocytosis and antigen presentation to T Cells require Vav and Dynamin.** *J Biol Chem*, 2009. **284**(36): p. 24088-24097.
167. Chaturvedi, A., Martz, R., Dorward, D., Waisberg, M. and Pierce, S.K., **Endocytosed BCRs sequentially regulate MAPK and Akt signaling pathways from intracellular compartments.** *Nat Immunol*, 2011. **12**(11): p. 1119-1130.
168. Petrie, R.J. and Deans, J.P., **Colocalization of the B cell receptor and CD20 followed by activation-dependent dissociation in distinct lipid rafts.** *J Immunol Res*, 2002. **169**(6): p. 2886-2891.
169. Perez, H.L., Cardarelli, P.M., Deshpande, S., Gangwar, S., Schroeder, G.M., Vite, G.D. and Borzilleri, R.M., **Antibody-drug conjugates: current status and future directions.** *Drug Discov Today*, 2014. **19**(7): p. 869-881.
170. Kreitman, R.J., Hansen, H.J., Jones, A.L., Fitzgerald, D.J.P., Goldenberg, D.M. and Pastan, I., **Pseudomonas exotoxin-based immunotoxins containing the antibody LI2 or LI2-Fab' induce regression of subcutaneous human B-Cell lymphoma in mice.** *Canc Res*, 1993. **53**(4): p. 819-825.
171. Wayne, A.S., Kreitman, R.J., Findley, H.W., Lew, G., Delbrook, C., Steinberg, S.M., Stetler-Stevenson, M., FitzGerald, D.J. and Pastan, I., **Anti-CD22 immunotoxin RFB4(dsFv)-PE38 (BL22) for CD22-positive hematologic malignancies of childhood: preclinical studies and phase I clinical trial.** *Clin Cancer Res*, 2010. **16**(6): p. 1894-1903.
172. Volkman, D.J., Ahmad, A., Fauci, A.S. and Neville, D.M., Jr., **Selective abrogation of antigen-specific human B cell responses by antigen-ricin conjugates.** *J Exp Med*, 1982. **156**(2): p. 634-639.
173. Grailer, A.P., Nichols, J.C., Strom, T.B., Sollinger, H.W. and Burlingham, W.J., **Inhibition of human antigen-specific memory B cell response in vitro by a diphtheria toxin-related interleukin 2 fusion protein.** *Cell Immunol*, 1991. **132**(2): p. 481-493.
174. Wang, J., Lozier, J., Johnson, G., Kirshner, S., Verthelyi, D., Pariser, A., Shores, E. and Rosenberg, A., **Neutralizing antibodies to therapeutic enzymes: considerations for testing, prevention and treatment.** *Nat Biotechnol*, 2008. **26**(8): p. 901-908.
175. Shankar, G., Devanarayan, V., Amaravadi, L., Barrett, Y.C., Bowsher, R., Finco-Kent, D., Fiscella, M., Gorovits, B., Kirschner, S., Moxness, M., Parish, T., Quarmby, V., Smith, H., Smith, W., Zuckerman, L.A. and Koren, E., **Recommendations for the validation of immunoassays used for detection of host antibodies against biotechnology products.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2008. **48**(5): p. 1267-1281.
176. Weldon, J.E., Skarzynski, M., Therres, J.A., Ostovitz, J.R., Zhou, H., Kreitman, R.J. and Pastan, I., **Designing the Furin-cleavable linker in recombinant immunotoxins based on Pseudomonas exotoxin A.** *Bioconjug Chem*, 2015. **26**(6): p. 1120-1128.
177. Thompson, J., Hu, H.Z., Scharff, J. and Neville, D.M., **Anti-Cd3 single-chain immunotoxin with a truncated diphtheria-toxin avoids inhibition by preexisting antibodies in human blood.** *Journal of Biological Chemistry*, 1995. **270**(47): p. 28037-28041.
178. Manning, M.L., Mason-Osann, E., Onda, M. and Pastan, I., **Bortezomib reduces preexisting antibodies to recombinant immunotoxins in mice.** *Canc Res*, 2014. **74**(19).
179. Hassan, R., Miller, A.C., Sharon, E., Thomas, A., Reynolds, J.C., Ling, A., Kreitman, R.J., Miettinen, M.M., Steinberg, S.M., Fowler, D.H. and Pastan, I., **Major cancer regressions in mesothelioma after treatment with an anti-mesothelin immunotoxin and immune suppression.** *Sci Transl Med*, 2013. **5**(208).
180. Schneider, A.K., Vainshtein, I., Roskos, L.K., Chavez, C., Sun, B. and Liang, M., **An immunoinhibition approach to overcome the impact of pre-existing antibodies on cut point establishment for immunogenicity assessment of moxetumomab pasudotox.** *J Immunol Methods*, 2016: p. 68-76.
181. Hristodorov, D., Nordlohne, J., Mladenov, R., Huhn, M., Fischer, R., Thepen, T. and Barth, S., **Human microtubule-associated protein tau mediates targeted killing of CD30(+) lymphoma cells in vitro and inhibits tumour growth in vivo.** *Br J Haematol*, 2014. **164**(2): p. 251-257.
182. Yarranton, G.T., **Inducible vectors for expression in mammalian cells.** *Curr Opin Biotechnol*, 1992. **3**(5): p. 506-511.
183. Jaisser, F., **Inducible gene expression and gene modification in transgenic mice.** *J Am Soc Nephrol*, 2000. **11**(11): p. S95-S100.

184. Kaufman, R.J., **Overview of vector design for mammalian gene expression.** *Mol Biotechnol*, 2000. **16**(2): p. 151-160.
185. Jabulowsky, R.A., Oberoi, P., Bahr-Mahmud, H., Dalken, B. and Wels, W.S., **Surface charge-modification prevents sequestration and enhances tumor-cell specificity of a recombinant granzyme B-TGF alpha fusion protein.** *Bioconjugate Chemistry*, 2012. **23**(8): p. 1567-1576.
186. Matsuo, Y. and Drexler, H.G., **Establishment and characterization of human B cell precursor-leukemia cell lines.** *Leuk Res*, 1998. **22**(7): p. 567-579.
187. Niuro, H. and Clark, E.A., **Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals.** *Nat Rev Immunol*, 2002. **2**(12): p. 945-956.
188. Heusel, J.W., Wesselschmidt, R.L., Shresta, S., Russell, J.H. and Ley, T.J., **Cytotoxic lymphocytes require granzyme-B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target-cells.** *Cell*, 1994. **76**(6): p. 977-987.
189. Shi, L.F., Mai, S., Israels, S., Browne, K., Trapani, J.A. and Greenberg, A.H., **Granzyme B (GraB) autonomously crosses the cell membrane and perforin initiates apoptosis and GraB nuclear localization.** *J Exp Med*, 1997. **185**(5): p. 855-866.
190. Fuchs, H., Bachran, C. and Flavell, D., **Diving through membranes: molecular cunning to enforce the endosomal escape of antibody-targeted anti-tumor toxins.** *Antibodies*, 2013. **2**(2): p. 209-235.
191. Kurschus, F.C., Kleinschmidt, M., Fellows, E., Dornmair, K., Rudolph, R., Lilie, H. and Jenne, D.E., **Killing of target cells by redirected granzyme B in the absence of perforin.** *FEBS Letters*, 2004. **562**(1-3): p. 87-92.
192. Lizzi, A.R., D'Alessandro, A.M., Zeolla, N., Brisdelli, F., D'Andrea, G., Pitari, G., Oratore, A., Bozzi, A. and Ippoliti, R., **The effect of AZT and chloroquine on the activities of ricin and a saporin-transferrin chimeric toxin.** *Biochem Pharmacol*, 2005. **70**(4): p. 560-569.
193. Oberoi, P., Jabulowsky, R. and Wels, W., **Selective induction of cancer cell death by targeted granzyme B.** *Antibodies*, 2013. **2**(1): p. e25220-25221 - e25220-25223.
194. Lee, S.J., Silverman, E. and Bargman, J.M., **The role of antimalarial agents in the treatment of SLE and lupus nephritis.** *Nat Rev Nephrol*, 2011. **7**(12): p. 718-729.
195. Thome, R., Issayama, L.K., DiGangi, R., Bombeiro, A.L., da Costa, T.A., Ferreira, I.T., de Oliveira, A.L. and Verinaud, L., **Dendritic cells treated with chloroquine modulate experimental autoimmune encephalomyelitis.** *Immunol Cell Biol*, 2014. **92**(2): p. 124-132.
196. Darrah, E. and Rosen, A., **Granzyme B cleavage of autoantigens in autoimmunity.** *Cell Death Differ*, 2010. **17**(4): p. 624-632.
197. Francisco, J.A., Cerveny, C.G., Meyer, D.L., Mixan, B.J., Klussman, K., Chace, D.F., Rejniak, S.X., Gordon, K.A., DeBlanc, R., Toki, B.E., Law, C.L., Doronina, S.O., Siegall, C.B., Senter, P.D. and Wahl, A.F., **cAC10-vcMMAE, an anti-CD30-monomethyl auristatin E conjugate with potent and selective antitumor activity.** *Blood*, 2003. **102**(4): p. 1458-1465.
198. Jain, N., Smith, S.W., Ghone, S. and Tomczuk, B., **Current ADC linker chemistry.** *Pharm Res*, 2015. **32**(11): p. 3526-3540.
199. Wang, H.Q., Rangan, V.S., Sung, M.C., Passmore, D., Kempe, T., Wang, X.L., Thevanayagam, L., Pan, C., Rao, C., Srinivasan, M., Zhang, Q., Gangwar, S., Deshpande, S., Cardarelli, P., Marathe, P. and Yang, Z., **Pharmacokinetic characterization of BMS-936561, an anti-CD70 antibody-drug conjugate, in preclinical animal species and prediction of its pharmacokinetics in humans.** *Biopharm Drug Dispos*, 2016. **37**(2): p. 93-106.
200. Hamilton, J.A., Li, J., Wu, Q., Yang, P., Luo, B., Li, H., Bradley, J.E., Taylor, J.J., Randall, T.D., Mountz, J.D. and Hsu, H.C., **General approach for tetramer-based identification of autoantigen-reactive B cells: characterization of La- and snRNP-reactive B cells in autoimmune BXD2 mice.** *J Immunol Res*, 2015. **194**(10): p. 5022-5034.
201. Mitchison, T.J., **The proliferation rate paradox in antimitotic chemotherapy.** *Mol Biol Cell*, 2012. **23**(1): p. 1-6.
202. Nissinen, M., Vuolteenaho, R., Boothandford, R., Kallunki, P. and Tryggvason, K., **Primary structure of the human laminin a-chain - limited expression in human tissues.** *Biochem J*, 1991. **276**: p. 369-379.
203. Harrison, D., Hussain, S.A., Combs, A.C., Ervasti, J.M., Yurchenco, P.D. and Hohenester, E., **Crystal structure and cell surface anchorage sites of laminin alpha 1LG4-5.** *J Biol Chem*, 2007. **282**(15): p. 11573-11581.
204. Celik, E. and Calik, P., **Production of recombinant proteins by yeast cells.** *Biotechnol Adv*, 2012. **30**(5): p. 1108-1118.
205. Andersen, D.C. and Krummen, L., **Recombinant protein expression for therapeutic applications.** *Curr Opin Biotechnol*, 2002. **13**(2): p. 117-123.
206. Bandaranayake, A.D. and Almo, S.C., **Recent advances in mammalian protein production.** *FEBS Lett*, 2014. **588**(2): p. 253-260.

207. Seret, G., Canas, F., Pougnet-Di Costanzo, L., Hanrotel-Saliou, C., Jousse-Joulin, S., Le Meur, Y., Saraux, A., Valeri, A., Putterman, C., Youinou, P., Rojas-Villarraga, A., Anaya, J.M. and Renaudineau, Y., **Anti-alpha-actinin antibodies are part of the anti-cell membrane antibody spectrum that characterize patients with lupus nephritis.** *J Autoimmun*, 2015. **61**: p. 54-61.
208. Skubitz, A.P., Letourneau, P.C., Wayner, E. and Furcht, L.T., **Synthetic peptides from the carboxy-terminal globular domain of the A chain of laminin: their ability to promote cell adhesion and neurite outgrowth, and interact with heparin and the beta 1 integrin subunit.** *J Cell Biol*, 1991. **115**(4): p. 1137-1148.
209. Kariya, Y., Ishida, K., Tsubota, Y., Nakashima, Y., Hirosaki, T., Ogawa, T. and Miyazaki, K., **Efficient expression system of human recombinant laminin-5.** *J Biochem*, 2002. **132**(4): p. 607-612.
210. Hohenester, E., Tisi, D., Talts, J.F. and Timpl, R., **The crystal structure of a laminin G-like module reveals the molecular basis of alpha-dystroglycan binding to laminins, perlecan, and agrin.** *Molecular Cell*, 1999. **4**(5): p. 783-792.
211. Talts, J.F., Andac, Z., Gohring, W., Brancaccio, A. and Timpl, R., **Binding of the G domains of laminin alpha 1 and alpha 2 chains and perlecan to heparin, sulfatides, alpha-dystroglycan and several extracellular matrix proteins.** *EMBO J*, 1999. **18**(4): p. 863-870.
212. Talts, J.F., Sasaki, T., Miosge, N., Gohring, W., Mann, K., Mayne, R. and Timpl, R., **Structural and functional analysis of the recombinant G domain of the laminin alpha 4 chain and its proteolytic processing in tissues.** *J Biol Chem*, 2000. **275**(45): p. 35192-35199.
213. Yamaguchi, H., Yamashita, H., Mori, H., Okazaki, I., Nomizu, M., Beck, K. and Kitagawa, Y., **High and low affinity heparin-binding sites in the G domain of the mouse laminin alpha 4 chain.** *J Biol Chem*, 2000. **275**(38): p. 29458-29465.
214. Suzuki, N., Ichikawa, N., Kasai, S., Yamada, M., Nishi, N., Morioka, H., Yamashita, H., Kitagawa, Y., Utani, A., Hoffman, M.P. and Nomizu, M., **Syndecan binding sites in the laminin alpha1 chain G domain.** *Biochemistry*, 2003. **42**(43): p. 12625-12633.
215. Jia, B. and Jeon, C.O., **High-throughput recombinant protein expression in Escherichia coli: current status and future perspectives.** *Open Biol*, 2016. **6**(8): p. e1-17.
216. Ito, R., Takahashi, T., Katano, I. and Ito, M., **Current advances in humanized mouse models.** *Cell Mol Immunol*, 2012. **9**(3): p. 208-214.
217. Gong, H.B., Kovar, J.L., Baker, B., Zhang, A.H., Cheung, L., Draney, D.R., Correa, I.R., Xu, M.Q. and Olive, D.M., **Near-infrared fluorescence imaging of mammalian cells and xenograft tumors with SNAP-tag.** *Plos One*, 2012. **7**(3): p. e1-8.
218. Gronemeyer, T., Chidley, C., Juillerat, A., Heinis, C. and Johnsson, K., **Directed evolution of O-6-alkylguanine-DNA alkyltransferase for applications in protein labeling.** *Protein Eng Des Sel*, 2006. **19**(7): p. 309-316.
219. Wolf, P., Alt, K., Wetterauer, D., Buhler, P., Gierschner, D., Katzenwadel, A., Wetterauer, U. and Elsasser-Beile, U., **Preclinical evaluation of a recombinant anti-prostate specific membrane antigen single-chain immunotoxin against prostate cancer.** *J Immunother*, 2010. **33**(3): p. 262-271.
220. Suurmond, J. and Diamond, B., **Autoantibodies in systemic autoimmune diseases: specificity and pathogenicity.** *J Clin Invest*, 2015. **125**(6): p. 2194-2202.
221. Mahler, M., Meroni, P.L., Bossuyt, X. and Fritzler, M.J., **Current concepts and future directions for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies.** *J Immunol Res*, 2014: p. e1-18.

VII Anhang

VII.1 Vektorkarten und Sequenzen

VII.1.1 Vektorkarten

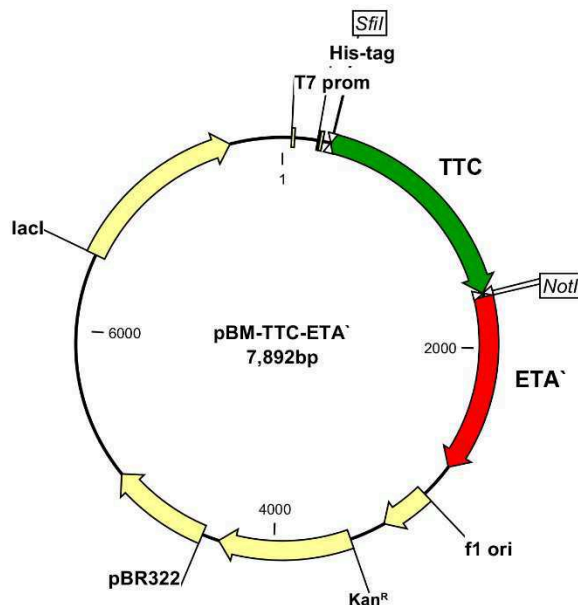


Abbildung 32 Vektorkarte pBM-TTC-ETA'

Die TTC DNA Sequenz liegt N-terminal vor der verkürzten ETA' Sequenz im pBM- Vektor. Abkürzungen T7-Prom – T7 Promotor, pelB – Signalpeptid, His-tag – Histidin-Affinitäts-tag (10x), TTC – Tetanus Toxin Fragment C, ETA' – gekürzte Version des *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A, f1 ori – Replikationsursprung, Kan^R – Kanamycin Resistenzgen, pBR322 – Replikationsursprung für *E. coli*, lacI – Lactose Operon.

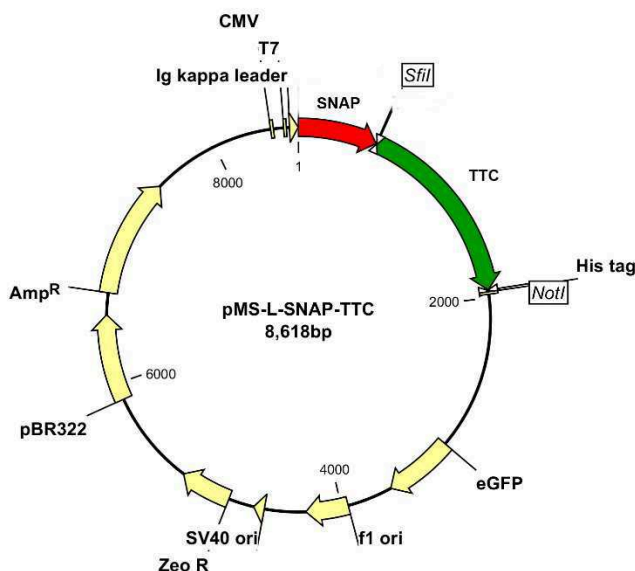


Abbildung 33 Vektorkarte pMS-SNAP-TTC

Die TTC DNA Sequenz liegt in diesem pMS-Vektor C-terminal hinter der SNAP Sequenz. Abkürzungen: T7-Prom – T7 Promotor, CMV – konstitutiver aktiver Promotor für das Cytomegalovirus (CMV), Ig-kappa – Signalpeptid zur Sekretions in Zellkulturüberstand, His-tag – Histidin-Affinitätstag (6x), eGFP- modifizierte grün-fluoreszierendes Protein, f1 ori – Replikationsursprung, SV40 ori- SV40 Replikationsursprung für HEK

293T Zellen, Zeo^R – Zeozin Resistenzgen, pBR322 – Replikationsursprung für *E. coli*, Amp^R – Ampillicin Resistenzgen

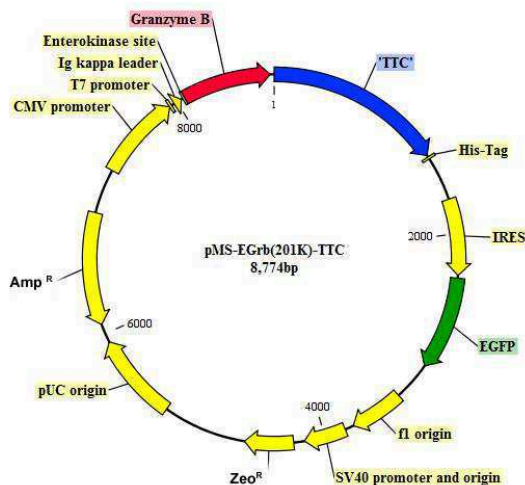


Abbildung 34 Vektorkarte pMS-EGB(R201K)-TTC

Die TTC DNA Sequenz liegt in diesem pMS-Vektor C-terminal hinter der GrB(R201K) Sequenz. Abkürzungen: CMV – konstitutiver Promotor für das Cytomegalovirus (CMV), T7-Prom – T7 Promotor, Ig-kappa – Signalpeptid zur Sekretion in den Zellkulturüberstand, His-tag – Histidin-Affinitätstag (6x), eGFP- modifizierte grün-fluoreszierendes Protein, fl ori – Replikationsursprung, SV40 ori- SV40 Replikationsursprung für HEK 293T Zellen, Zeo^R – Zeozin Resistenzgen, pUC ori – Replikationsursprung für *E. coli*, Amp^R – Ampillicin Resistenzgen.

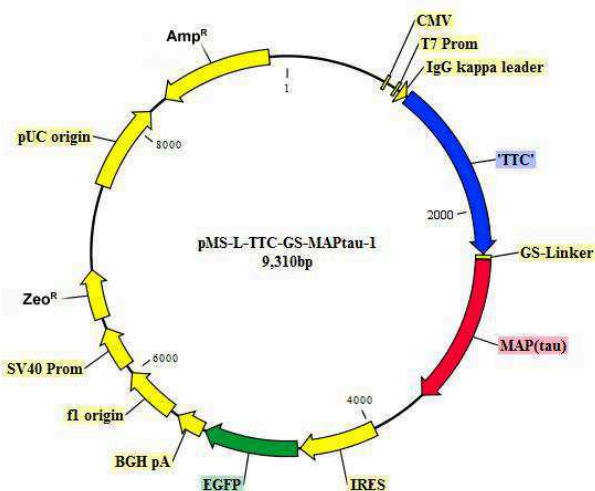


Abbildung 35 Vektorkrte pMS-TTC-GS-MAPTau

Die TTC DNA Sequenz liegt in diesem pMS-Vektor C-terminal hinter der GrB(R201K) Sequenz. Abkürzungen: CMV – konstitutiver Promotor für das Cytomegalovirus (CMV), T7-Prom – T7 Promotor, Ig-kappa – Signalpeptid zur Sekretion in den Zellkulturüberstand, His-tag – Histidin-Affinitätstag (6x), eGFP- modifizierte grün-fluoreszierendes Protein, fl ori – Replikationsursprung für HEK 293T Zellen, SV40 ori- SV40 Replikationsursprung, Zeo^R – Zeozin Resistenzgen, pUC ori – Replikationsursprung für *E. coli*, Amp^R – Ampillicin Resistenzgen.

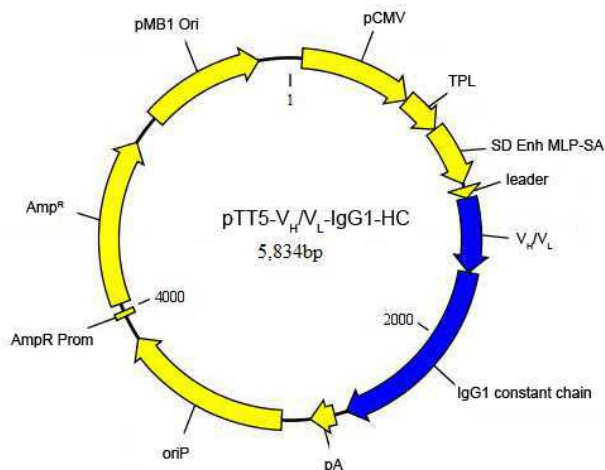


Abbildung 36 Vektorkarte pTT5-VH/VL-IgG1-HC

Der pTT5 Vektor ist für die Expression von Antikörperketten (leichte, schwere) in eukaryotischer Expressionssystemen. Abkürzungen: CMV – konstitutiver Promotor für das Cytomegalovirus (CMV), TPL und MLP – Adenovirus tripartite Signalpeptide und Verstärker („enhancer“) des späten Promotors, SP – murine Immunglobulin schwere Kette signal Peptide, VH variable Region der schweren Kette, VL – variable Region der leichten Kette, IgG1 constant chain – konstante Region des humane IgG1 der schweren Kette, pA Polyadenylierungssignal, oriP – Relikationsursprung für HEK 6E Zellen, Amp^R – Ampicillin Resistenzgen in *E. coli*, pMB1 ori – Replikationsursprung für *E. coli*.

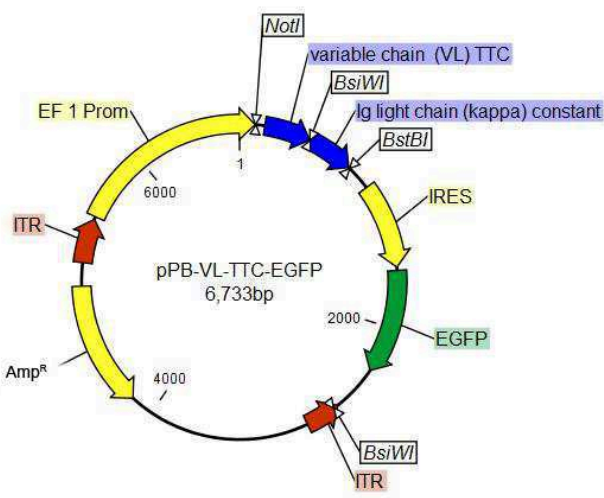


Abbildung 37 Vektorkarte pPB-VL-TTC-EGFP

Die variable Sequenz des anti-TTC Antikörpers 5E4 liegt N-terminal vor der konstanten Domäne der leichten Antikörperkette. Abkürzungen: Leader - murine Signalsequenz zur Sekretion des Proteins aus der Zelle, VL TTC – variable Domäne der leichten Antikörperkette, Ig light chain – konstante Domäne (kappa) der leichten Antikörperkette, IRES - „internal ribosome entry site“ zur Co-Expression des Reporter Proteins eGFP, eGFP - modifiziertes grün-fluoreszierendes Protein, ITR – „inverted terminated repeats“ Erkennungssequenz für die Transposase, Amp^R – Ampicillin Resistenzgen.

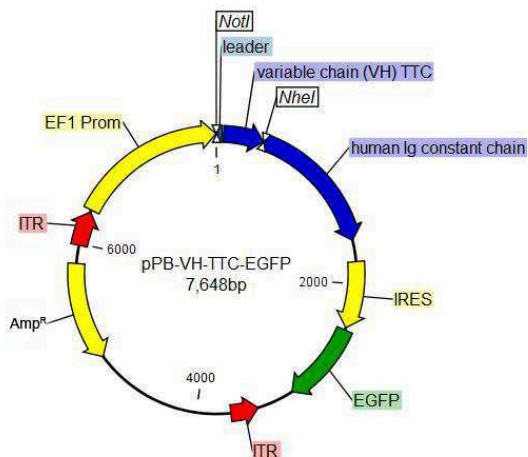


Abbildung 38 Vektorkarte pPB-VH-TTC-EGFP

Die variable Sequenz des anti-TTC Antikörpers 5E4 liegt N-terminal vor der konstanten Domäne der leichten Antikörperkette. Abkürzungen: Leader - murine Signalsequenz zur Sekretion des Proteins aus der Zelle, VH TTC - variable Domäne der schweren Antikörperkette, Ig heavy chain - konstante Domäne (kappa) der schweren Antikörperkette, IRES - „internal ribosome entry site“ zur Co-Expression des Reporter Proteins eGFP, eGFP - modifiziertes grün-fluoreszierendes Protein, ITR - „inverted terminated repeats“ Erkennungssequenz für die Transposase, Amp^R - Ampicillin Resistenzgen, EF1 Prom - Promotor.

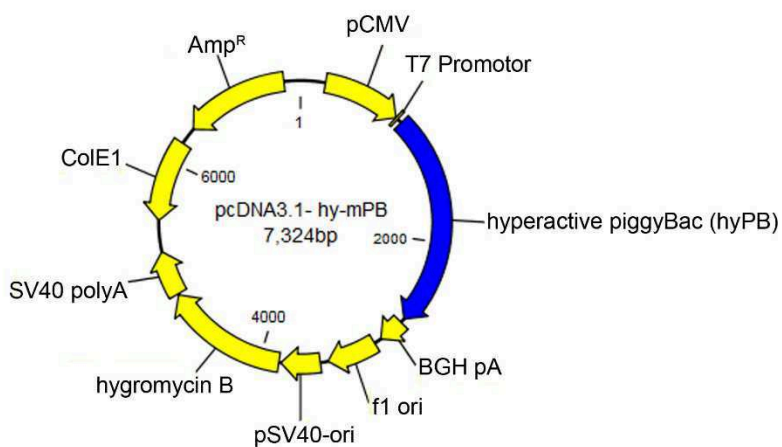


Abbildung 39 Vektorkarte pcDNA3.1-hy-mPB

Dieser Vektor dient für die Expression der hyperaktiven *piggyBac* Transposase (hyPB). Abkürzungen: pCMV konstitutiver aktiver Promotor für das Cytomegalovirus (CMV), BGH pA - Polyadenylierungssequenz, f1 ori - Replikationsursprung, pSV40 ori - Replikationsursprung für eukaryotische Zellen, hygromycin B - Hygromycin B Resistenzgen, SV40 polyA - Polyadenylierungssignal, ColE1 - Replikationsursprung, Amp^R - Ampicillin Resistenzgen.

VII.1.2 Sequenzen

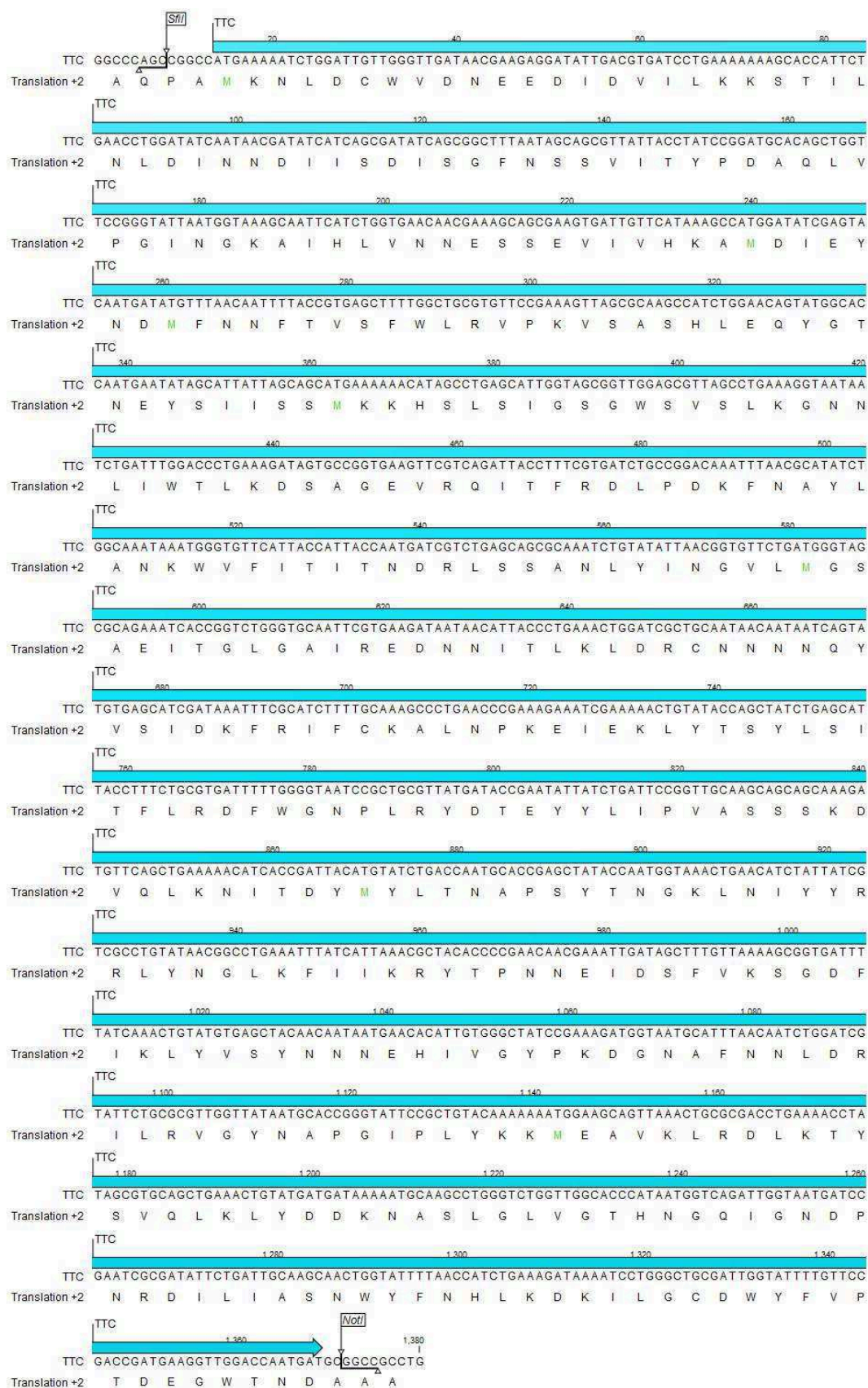


Abbildung 40: Sequenz des Tetanus Toxoid Fragment C

Dargestellt ist die cDNA Sequenz des TTC inklusive der Restriktionsschnittstellen *SfiI* und *NotI*.

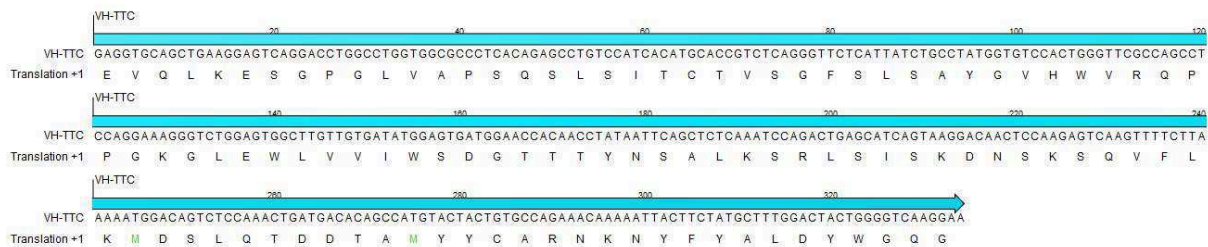


Abbildung 41: Sequenz der variablen Region der schweren Kette (V_H) des anti-TTC Antikörpers 5E4

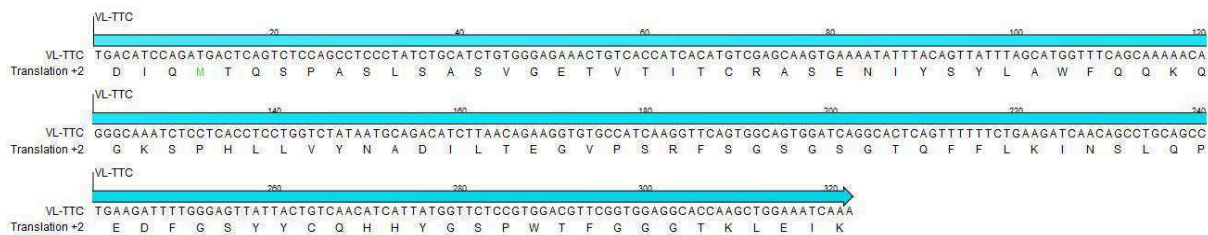


Abbildung 42: Sequenz der variablen Region der leichten Kette (V_L) des anti-TTC Antikörpers 5E4

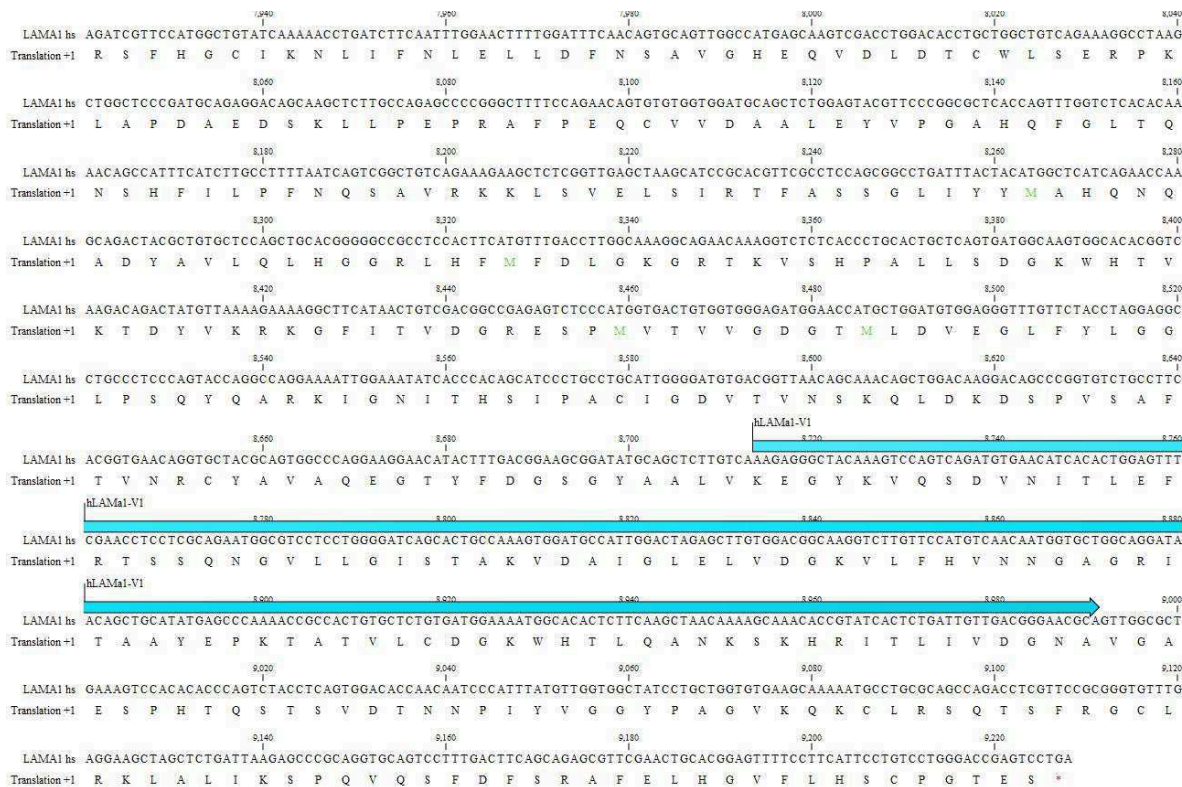


Abbildung 43: Sequenz der hLAMA1-V1 Variante

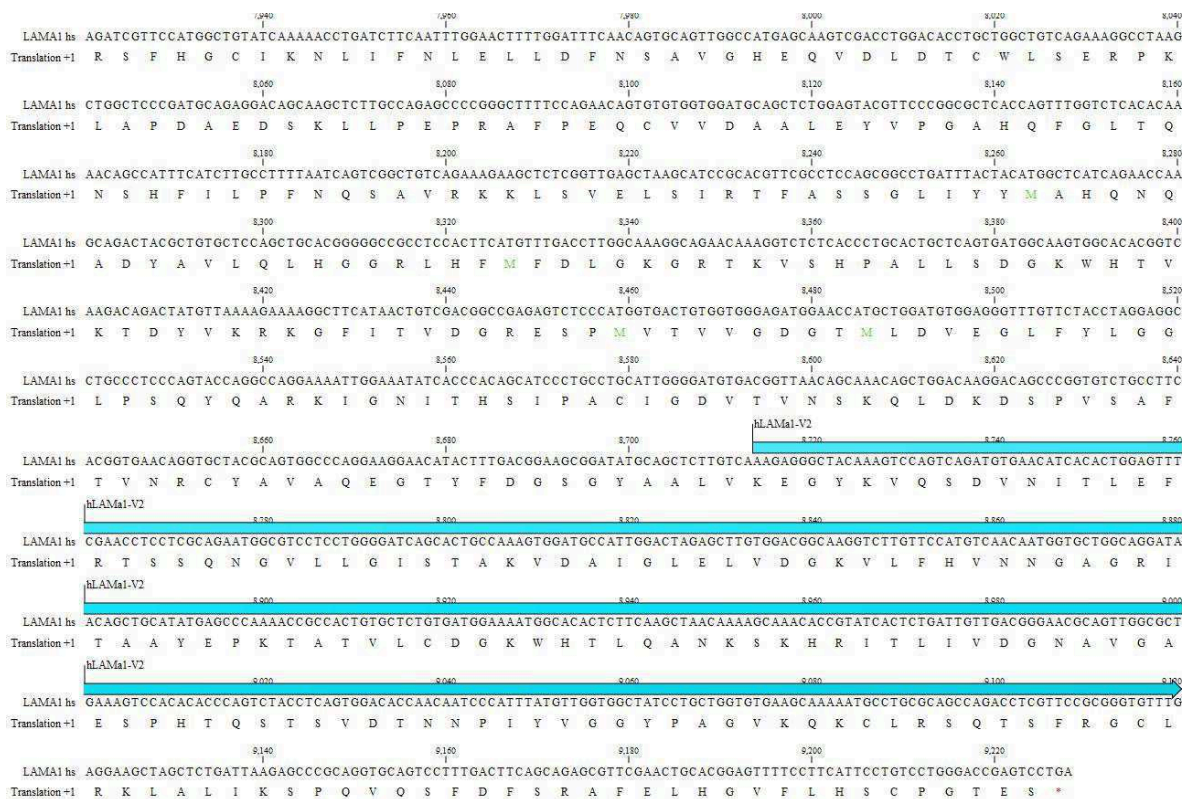


Abbildung 44: Sequenz der hLAMa1-V2 Variante



Abbildung 45: Sequenz der hLAMa1-V3 Variante

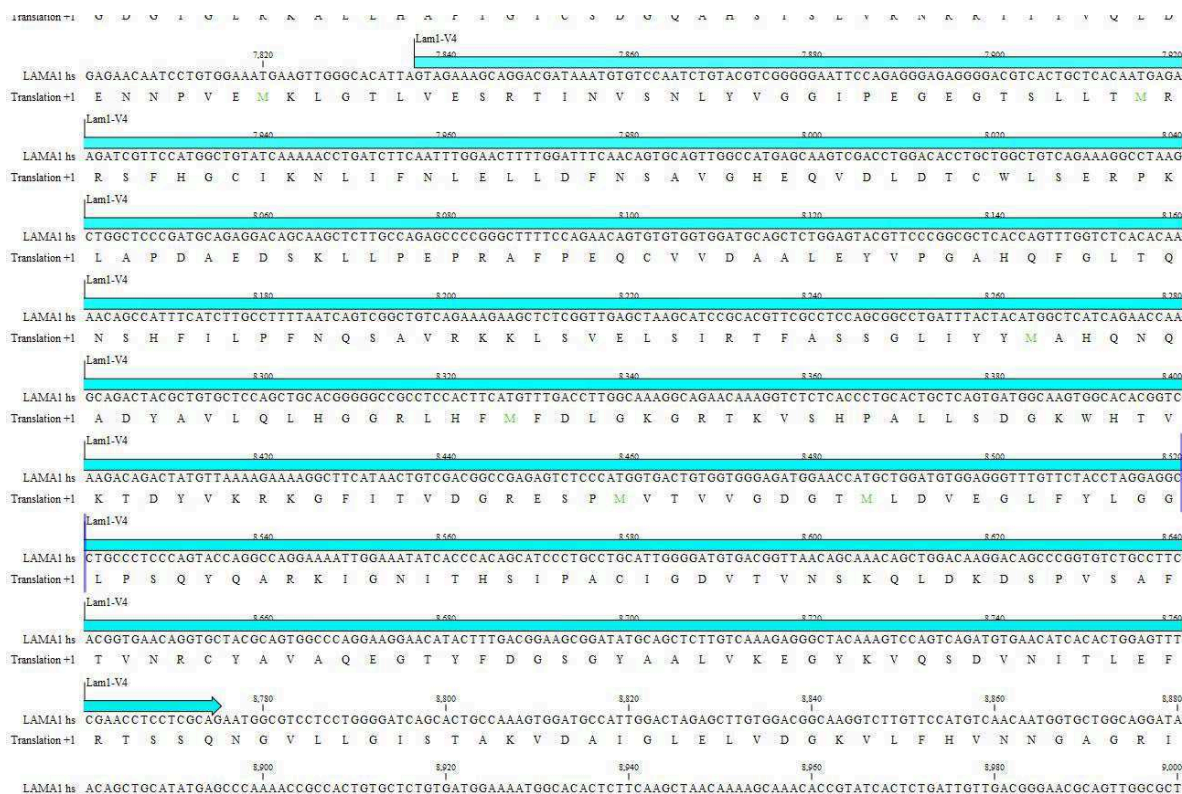


Abbildung 46: Sequenz der hLAMA1-V4 Variante

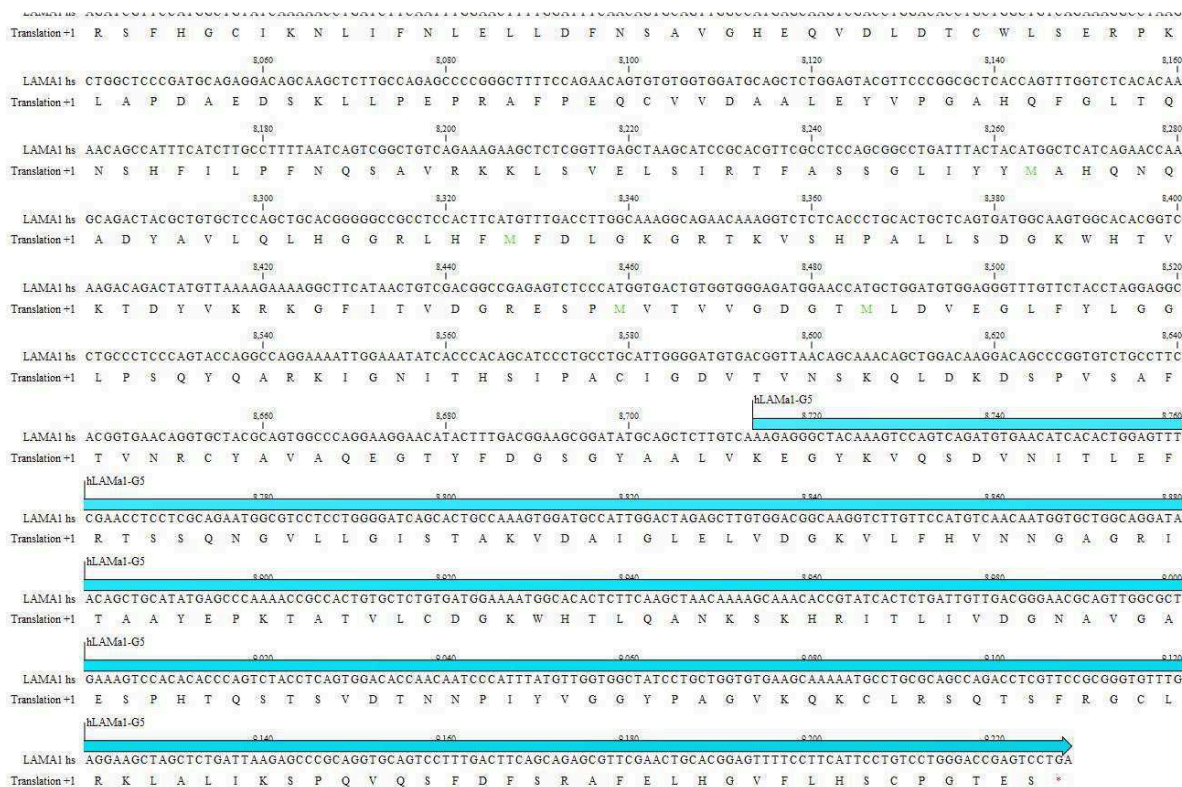


Abbildung 47: Sequenz der hLAMA1-G5 Variante



Abbildung 48: Sequenz der hLAMa1-V6 Variante



Abbildung 49: Sequenz mLAMa1-V6 Variante

VII.2 Abkürzungsverzeichnis

+	Rezeptor wird exprimiert
++ oder high	Rezeptor wird überexprimiert
-	Rezeptor wird nicht exprimiert
α	anti-
AIK	Autoimmunerkrankung
Ak	Antikörper
ANA	anti-nukleäre Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
AV	Annexin V
BG	O ⁶ -Benzylguanin
BCR	B cell receptor
BZR	B-Zell-Rezeptor
CD	Differenzierungscluster
Coo	„Coomassie Brilliant Blue“ Färbung
CQ	Chloroquin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	Doppelstrang
DTT	Dithiothreitol
DZ	Durchflusszytometrie
EKS	Enterokinase-Schnittstelle
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	„enhanced“ grün fluoreszierendes Protein
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ER	endoplasmatisches Retikulum

ETA'	Deletionsmutante des <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Exotoxin A
ETA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Exotoxin A
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Fluoresceinisothiocyanate
GrB	Granzym B
h	human
HC	konstanter Bereich der schweren Kette
His	Histidin
hLAMA1	humane Laminin α 1-Kette
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INF	Interferon
IT	Immuntoxin
ITR	“inverted terminal repeat”
LAMA1	Laminin α 1-Kette
LC	konstanter Bereich der leichten Kette
LN	Lupusnephritis
m	murin
mAk	monoklonaler Antikörper
MS	Multiple Sklerose
MW	Molekulargewicht
NBT/BCIP	Nitro-Blau Tetrazolium Chlorid/5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphat
OD	optische Dichte
PCR	Polymerasekettenreaktion (“polymerase chain reaction”)
PE	Phycoerythrin
PE38	Deletionsmutante des <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Exotoxin A

PI	Propidiumiodid
RA	Rheumatoide Arthritis
RT	Raumtemperatur
scFv	<i>“single-chain variable fragment”</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
SNAP	O-6-Alkylguanin-Alkyltransferase
tg	transgen
TLR	Toll-like Rezeptor
v/v	Volumenprozent (<i>“volume per volume”</i>)
V _H	variabler Bereich der schweren Kette
V _L	variabler Bereich der leichten Kette
w/v	Gewichtsprozent (<i>„weight per volume“</i>)
WB	Western Blot
XTT	2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid-Salz

VII.3 Index der Abbildungen und Tabellen

VII.3.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Struktur des extrazellulären Matrixproteins Laminin-1.	3
Abbildung 2: Übersicht zur Rolle autoreaktiver B-Lymphozyten.	5
Abbildung 3: Antigen-spezifische Elimination autoreaktiver B-Zellen mit zytotoxisch wirksamen Fusionsproteinen.	10
Abbildung 4: Transposase-basierter Gentransfer mittels Transpo-mAb® Technologie.	14
Abbildung 5 Darstellung des Arbeitsablaufes als Flussdiagramm.	17
Abbildung 6: Expressionsvektoren der TTC-basierten Fusionsproteine.	41
Abbildung 7: Herstellung der TTC-Fusionsproteine und Markierung des SNAP-TTC Proteins mittels BG-modifizierter Fluoreszenzfarbstoffe.	42
Abbildung 8: Bindungsanalyse der rekombinanten TTC-Fusionsproteine an Hybridomzellen.	43
Abbildung 9: Quantitative Bestimmung der B-Zellrezeptoren auf der Zelloberfläche von TTC-reaktiven Hybridomzelllinie 5E4 vor und nach Zellstimulation.	44
Abbildung 10: Internalisierungsstudie des rekombinanten SNAP-TTC-BG-488 Proteins auf Hybridomzellen.	46
Abbildung 11: Zytotoxische Aktivität TTC-basierter Proteine auf verschiedenen Hybridomzellen. ...	47
Abbildung 12 Bindungsanalyse SNAP-TTC-BG-647 Protein an polyklonal aktivierten CD19 ⁺ humanen B-Zellen.	48
Abbildung 13: Zytotoxische Aktivität des rekombinanten TTC-ETA' Proteins auf Tetanustoxin-spezifischen humanen Gedächtnis-B-Zellen nach polyklonaler Stimulation.	50
Abbildung 14: Herstellung von EGrB(R201K)-TTC und TTC-MAPTau.	52
Abbildung 15: <i>In vitro</i> -Charakterisierung der Proteine GrB(R201K)-TTC und TTC-MAPTau.	53
Abbildung 16: Transposase-basierte pPB-V _H /V _L -TTC Expressionsvektoren für die Transfektion von humanen lymphozytischen REH-Zellen.	54
Abbildung 17: Transfektionseffizienz und Selektionsrunden positiv transfizierter REH-Zellen.	55
Abbildung 18: Nachweis der B-Zellrezeptoren auf transfizierten REH-Zellen.	56
Abbildung 19: Bindungsnachweis der rekombinanten TTC-basierten Fusionsproteine auf TTC-reaktiven REH-Zellen.	57
Abbildung 20: Internalisierungsanalyse der TTC-Proteine auf lymphozytischen TTC-reaktiven REH-Zellen.	58
Abbildung 21: Zytotoxische Aktivität der TTC-Fusionsproteine auf humanen TTC-reaktiven REH-Zellen.	59
Abbildung 22: Bestimmung der proapoptotischen Aktivität TTC-basierter Fusionsproteine mittels AnnexinV/PI-Färbung.	60
Abbildung 23: Prozentualer Anteil apoptotischer REH-Zellen nach Behandlung mit TTC-Fusionsproteinen.	61

Abbildung 24: Schematische Darstellung der humanen Laminin $\alpha 1$ -Kette und der in dieser Studie verwendeten potentiellen Zellbindungsdomänen.....	63
Abbildung 25: Proteinreinigung der rekombinanten humanen LAMa1-Proteinvarianten.....	64
Abbildung 26: Nachweis von anti-LAMa1-Antikörper im Blutserum und im Urin von SLE-Patienten.....	65
Abbildung 27: SDS-PAGE und Western Blot der rekombinanten murinen LAMa1 Fusionsproteine.	67
Abbildung 28: Western Blot des SNAP-mLAMa1-V6 in den HEK 293T Zellen.....	68
Abbildung 29: Western Blot-Analyse muriner/humaner rekombinanter LAMa1-Proteine mit Laminin-reaktiven Hybridomüberständen.....	69
Abbildung 30: ELISA-Bindungsnachweis der Laminin-reaktiven Antikörper an rekombinante mLAMa1/hLAMa1 Proteine.....	70
Abbildung 31: Nachweis von anti-LAMa1-Antikörpern in transgenen K14-CD40L-Mäusen.....	71
Abbildung 32 Vektorkarte pBM-TTC-ETA`	102
Abbildung 33 Vektorkarte pMS-SNAP-TTC.....	102
Abbildung 34 Vektorkarte pMS-EGB(R201K)-TTC.....	103
Abbildung 35 Vektorkarte pMS-TTC-GS-MAPTau	103
Abbildung 36 Vektorkarte pTT5-VH/VL-IgG1-HC	104
Abbildung 37 Vektorkarte pPB-VL-TTC-EGFP	104
Abbildung 38 Vektorkarte pPB-VH-TTC-EGFP.....	105
Abbildung 39 Vektorkarte pcDNA3.1-hy-mPB.....	105
Abbildung 40: Sequenz des Tetanus Toxoid Fragment C.....	106
Abbildung 41: Sequenz der variablen Region der schweren Kette (V_H) des anti-TTC Antikörpers 5E4	107
Abbildung 42: Sequenz der variablen Region der leichten Kette (V_L) des anti-TTC Antikörpers 5E4	107
Abbildung 43: Sequenz der hLAMa1-V1 Variante.....	107
Abbildung 44: Sequenz der hLAMa1-V2 Variante.....	108
Abbildung 45: Sequenz der hLAMa1-V3 Variante.....	108
Abbildung 46: Sequenz der hLAMa1-V4 Variante.....	109
Abbildung 47: Sequenz der hLAMa1-G5 Variante.....	109
Abbildung 48: Sequenz der hLAMa1-V6 Variante.....	110
Abbildung 49: Sequenz mLAMa1-V6 Variante.....	110

VII.3.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Mechanismen der zielgerichteten B-Zell-Beeinflussung	7
Tabelle 2 Übersicht der verwendeten Enzyme, Standards und Kits.....	18
Tabelle 3 Zusammensetzung aller häufig verwendeten Puffer und Lösungen.....	20
Tabelle 4 Übersicht der verwendeten Antikörper.....	24
Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Bakterienstämme	25
Tabelle 6: Übersicht der synthetischen Oligonukleotide.....	25
Tabelle 7: Übersicht der verwendeten Vektoren, der synthetischen DNA und der cDNA-Klone	27
Tabelle 8: Übersicht der verwendeten eukaryotischen Zelllinien.	27
Tabelle 9: Übersicht der verwendeten BG-modifizierten Fluoreszenzfarbstoffe.....	28
Tabelle 10: PCR-Reaktionsansatz	29
Tabelle 11: PCR-Reaktionszyklen	29
Tabelle 12: ELISA Varianten.....	39
Tabelle 13: Übersicht rekombinanter Laminin Proteinvarianten	66
Tabelle 14: Rekombinante murine Laminin-Proteinvarianten	72

VII.4 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Prof. Dr. Rainer Fischer für die Möglichkeit meine Promotion am Fraunhofer Institut für Molekularbiologie und angewandte Ökologie IME Aachen durchführen zu können und für die Unterstützung während dieser Zeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Jürgen Bernhagen möchte ich mich für die freundliche Übernahme des Ko-Referats und bei Herrn Prof. Dr. Björn Usadel für die freundliche Übernahme der Rolle des Drittprüfers meiner Arbeit danken.

Prof. Dr. Dr. Stefan Barth möchte ich mich für seine Unterstützung während meiner Zeit in den Arbeitsgruppen Experimentelle Medizin & Immuntherapie (EMI) des Instituts für Angewandte Medizintechnik und Pharmazeutische Produktentwicklung (PPD) des Fraunhofer Instituts IME danken.

Herrn Dr. Thomas Nachreiner möchte ich mich für seine wissenschaftliche Betreuung und die Durchsicht der Arbeit herzlich bedanken.

Bei Frau Prof. Dr. Annett Jacobi und Frau Ute Saunders vom Uniklinikum Münster der Sektion Rheumatologie und Klinische Immunologie bedanke ich mich ganz herzlich für die gute und freundliche Zusammenarbeit innerhalb des gemeinsamen Projekts, für den vielfältigen wissenschaftlichen Austausch und die Durchsicht meiner Arbeit.

Frau Prof. Dr. Karin Loser und Christoph Baumann aus der Abteilung Experimentelle Dermatologie und Immunbiologie der Haut des Uniklinikum Münsters möchte ich in diesem Zusammenhang für die Bereitstellung der K14-CD40L tg Mausseren danken.

Herrn Dr. Beerli und Dr. Grawunder von NBE Therapeutics danke ich für die Möglichkeit der wissenschaftlichen Zusammenarbeit an der Transpo-mAb®-Technologie.

Für Hilfen an Geräten, bei Experimenten und die Bereitstellung von Material danke ich: Reinhard Rosinke, Anh Tuan Pham, Severin Schmies, Dr. Stephanie Kapelski, Dr. Stefano di Fiore, Dr. Christoph Stein, Dr. Grit Hermann-Titt und Dr. Rolf Fendel.

Einen sehr herzlichen Dank gilt Frau Dr. Birgit Orthen und Dr. Rolf Fendel für die viele Unterstützung gerade in der Endphase meiner Arbeit und die Durchsicht meiner Arbeit.

Frau Dr. Judith Niesen, Mira Voitok, Kai Fuhrmann, Gerrit Gresch, Elena Grieger, Lea Schenke und den lieben Kollegen im Büro möchte ich herzlichst für all die helfenden Hände, den Gedankenaustausch und seelische Unterstützung während der Jahre danken.

Schließlich möchte ich mich bei allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppen am Fraunhofer IME und AME für die tolle kollegiale Zeit bedanken.

Mein Dank gilt der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fraunhofer Institut für Molekularbiologie und angewandte Ökologie IME für die finanzielle Unterstützung während meiner Doktorarbeit.

Einen speziellen Dank gilt meinem Ehemann Holger Klose und meiner Familie für den ausnahmslosen Rückhalt, die seelische Unterstützung und ihr Vertrauen in mich während der Promotionszeit.

VII.5 Lebenslauf

Persönliche Daten

Diana Klose, geb. Pickert

geb. am 07.06.1984 in Eisenach

verheiratet, eine Tochter



Beruflicher Werdegang

01/2013 – 06/2016

Wissenschaftliche Mitarbeiterin zur Promotion zum Thema:
„Zielgerichtete Eliminierung autoreaktiver B-Lymphozyten mithilfe
Antigen-basierter Fusionsproteine“

01/2013 – 03/2015

angestellt am **Uniklinik RWTH Aachen**
Institut für Angewandte Medizintechnik, Abteilung für Experimentelle
Medizin & Immuntherapie, Prof. Dr. Dr. Stefan Barth

04/2015 – 06/2016

angestellt am **Fraunhofer Institut für Molekularbiologie und
Angewandte Oekologie IME**, Abteilung Immuntherapie (ehemals
Pharmazeutische Produktentwicklung), Dr. Jörn Schmitz

10/2010 – 12/2012

Wissenschaftliche Mitarbeiterin am **Fraunhofer-Institut für
Produktionstechnologie (IPT)** im Geschäftsfeld *Life Sciences
Engineering*

- Projektkoordination eines von der Fraunhofer-Zukunftsstiftung
geförderten interdisziplinären Projektes zur Abbildung des
manuellen Laborprozesses zur Herstellung von dreidimensionalen
Hautmodellen in einem automatisierten System
- Projektakquisition, Verfassen von Projektanträgen und
Ethikantrag
- Durchführung von Industrieprojekten
- Durchführung von biologischen Versuchsreihen in
Zusammenarbeit mit den Ingenieuren an Prototypen für den
automatisierten Biotechnologie-Bereich
- Unterstützung der Geschäftsfeldleitung

Weiterbildungen

06/2014

FELASA B Kurs, Institut für Versuchstierkunde,
Uniklinikum RWTH Aachen

Studium

10/2008 – 10/ 2010 an der **Beuth Hochschule für Technik**, Berlin
Studium: **Biotechnologie**
 Abschluss: Master of Science
 Note: 1,5

09/2004 – 02/2008 an der **Hochschule Lausitz**, Senftenberg
Studium: **Biotechnologie**
 Abschluss: Bachelor of Science
 Note: 1,7

Praktika und Studienabschlussarbeiten

02/2005 – 03/2005 **GENE-Therapeutics G.T.L. GmbH**, Luckenwalde

08/2006 – 01/2007 **Deutsche Krebsforschungszentrum**, Heidelberg, Abteilung
 Klinische Kooperationseinheit pädiatrische Onkologie
Praktisches Studiensemester: „Die Bedeutung der Histon
 Deacetylase 11 für die Malignität der Neuroblastom Zelllinie BE(2)-
 C“

08/2007 – 01/2008 **Deutsche Krebsforschungszentrum**, Heidelberg, Abteilung
 Klinische Kooperationseinheit pädiatrische Onkologie
Bachelor-Thesis: „Klonierung und funktionelle Analyse inaktiver
 HDAC Mutanten“

04/2008 – 09/2008 **Beiersdorf AG**, Hamburg, Forschungsabteilung Haar und Kopfhaut

08/2009 – 12/2009 **Bayer Schering Pharma AG**, Berlin, Abteilung Protein Technologies
Praktisches Studiensemester: „Klonierung und Evaluierung von
 Gateway kompatiblen Expressionsvektoren für die *in vitro*
 Translation“

02/2010 – 08/2010 **Bayer Schering Pharma AG**, Berlin, Abteilung Protein Technologies
Master-Thesis: „Anwendung der *in vitro* Translation in
 verschiedenen Prozessbereichen“

Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Marx U; **Pickert D**, Heymer A, Schmitt R, Non-invasive quality control for production processes of artificial skin equivalents by optical coherence tomography. *Procedia CIRP* 2013, 5:128–132

Oehme I, Deubzer HE, Wegener D, **Pickert D**, Linke JP, Hero B, Kopp-Schneider A, Westermann F, Ulrich SM, von Deimling A, Fischer M, Witt O, Histone deacetylase 8 in neuroblastoma tumorigenesis. *Clinical Cancer Research*, 2009, 5(1):91-9.

Klose D, Saunders U, Barth S, Fischer R, Jacobi AM, Nachreiner T Novel fusion proteins for the antigen-specific staining and elimination of B cell receptor-positive cell populations demonstrated by a tetanus toxoid fragment C (TTC) model antigen. *BMC Biotechnology*, 2016; 16:18

Klose D, Woitok M, Niesen J, Beerli R, Grawunder U, Barth S, Fischer R, Fendel R and Nachreiner T. Generation of an artificial human B cell line test system using the Transpo-mAb® technology to evaluate the therapeutic efficacy of novel antigen-specific fusion proteins, submitted to PLOS ONE

Woitok M, **Klose D**, DiFiore S, Richter W, Gresch G, Grieger E, Stein C, Barth S, Fischer R, Kolberg K, Niesen J, Comparison of mouse and human scFv-SNAP-auristatin F drug conjugates with potent activity against EGFR overexpressing solid tumor cells. submitted to Journal of Immunotherapy

Posterpräsentationen

Pickert D, Fischer R, Barth S, Nachreiner T, Selective manipulation of antigenspecific B-lymphocytes, Biomedica 2013, Aachen.

Woitok M, Niesen J, **Klose D**, Richter W, Abbas M, Fischer R, Barth S, Kolberg K The efficient elimination of tumor cells by EGFR-specific scFv-SNAP fusion proteins conjugated to auristatin F, Biomedica 2016, Aachen.

Woitok M, **Klose D**, Richter W, Barth S, Fischer R, Niesen J, Kolberg K The efficient elimination of tumor cells by HER2-specific scFv-SNAP fusion proteins conjugated to auristatin F. 32. Ernst Klenk Symposium, Dezember 2016, Köln, Deutschland