

Charakterisierung rekombinanter IgA- Antikörper gegen den EGFR

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
vorgelegt von

Diplom Biologe Stefan Lohse

Kiel, 2010

Referent: Prof. Dr. Holger Kalthoff, Kiel

Koreferent: Prof. Dr. Thomas C. Bosch, Kiel

Tag der mündlichen Prüfung: 25.06.2010

Zum Druck genehmigt: 25.06.2010

Prof. Dr. Lutz Kipp (Dekan)

Inhaltsangabe

1. Einleitung	1
1.1. Epitheliale Tumorerkrankungen	1
1.2. Der Epidermale Wachstumsfaktor Rezeptor (EGFR)	1
1.2.1. Die Familie der Rezeptoren epidermaler Wachstumsfaktoren	1
1.2.2. Physiologische Bedeutung der EGFR-Rezeptoren	2
1.2.3. Das Tumorantigen EGFR	5
1.2.4. Therapeutische Ansätze	5
1.3. Wirkmechanismen von Antikörpern	9
1.3.1. Antikörperisotypen	9
1.3.2. Die Immunglobuline vom IgG1- und IgA1-Isotyp	10
1.3.3. Strukturvariationen der IgA-Immunglobuline	11
1.3.4. Glykosylierung von IgG1- und IgA-Antikörpern	12
1.3.5. Polymere Immunglobulin Spezies	13
1.3.6. Fab-vermittelte Wirkmechanismen	14
1.3.7. Fc-vermittelte Wirkmechanismen	15
1.3.7.1. Fc-Rezeptor basierte Wirkmechanismen	15
1.3.7.2. Komplement-basierte Wirkmechanismen	18
1.3.8. Pharmakokinetik	19
1.3.9. Physiologische Bedeutung der Antikörper	20
1.3.9.1. Physiologische Bedeutung von IgG	20
1.3.9.2. Physiologische Bedeutung von IgA	21
1.4. Problemstellung	23
1.4.1. Voraussetzungen	23
1.4.2. Ziele	25
2. Material und Methoden	26
2.1. Materialien	26
2.2. Methoden	26
2.2.1. Zellbiologische Methoden	26
2.2.1.1. Kultivierung von Zellen	26
2.2.1.2. Isolierung von Immunzellen aus peripherem Blut	28
2.2.1.3. Adaption von CHO-Zellen an serumfreie Suspensionsbedingungen	29
2.2.1.4. Herstellung der Expressionsvektoren	30
2.2.1.5. Transfektion	32
2.2.1.6. Cytospin-Färbungen	34
2.2.1.7. Durchflusszytometrische Analysen	35
2.2.2. Antikörperproduktionssysteme	37
2.2.2.1. Hybridomkulturflaschen	37
2.2.2.2. Miniperm System	37
2.2.2.3. Celline CL1000 System	37
2.2.3. Biochemische Methoden	38
2.2.3.1. Bestimmung der spezifischen Produktionsrate mittels ELIS	38
2.2.3.2. Methoden zur Antikörperaufreinigung	39
2.2.3.2.1. Affinitätschromatographie mittels ahu- κ -Matrix	40
2.2.3.2.2. Immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie (IMAC)	41
2.2.3.2.3. Gelfiltration	42
2.2.3.3. Bestimmung der Proteinkonzentration	42
2.2.3.4. Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	42
2.2.3.4.1. Native PAGE	42
2.2.3.4.2. Denaturierende Gele	43
2.2.3.4.3. Silberfärbung	43
2.2.3.5. Elektrotransfer	43
2.2.3.6. Immundetektion	44
2.2.4. Funktionale Charakterisierung der Antikörper	44

2.2.4.1. Zellviabilitätstest	44
2.2.4.2. Transzytose	45
2.2.4.3. Antikörper abhängige Zytotoxizität (ADCC, CDC)	46
2.2.5. Kalkulation und Darstellung der Daten und statistische Analysen	47
3. Ergebnisse	48
3.1. Produktion und Charakterisierung der EGFR-gerichteten IgA-Antikörper	48
3.1.1. Expression der Antikörper in CHO-Zellen	48
3.1.2. Produktion und Produktivität	50
3.1.3. Aufreinigung der einzelnen IgA Konstrukte	54
3.1.4. Quantifizierung produzierten Antikörper	60
3.1.5. Bestimmung der Reinheit der Antikörper	61
3.1.6. Nachweis der korrekten Zusammenlagerung	66
3.1.7. Charakterisierung der EGFR-gerichteten IgA-Antikörper mittels Immunfluoreszenzen	69
3.1.8. Transzytose von dimerem 225-IgA1	74
3.2. Funktionelle Charakterisierung der EGFR-gerichteten IgA-Antikörper	78
3.2.1. Direkte Effektmechanismen der EGFR-gerichteten IgA-Antikörper	78
3.2.1.1 Blockade der Ligandenbindung	79
3.2.1.2. EGFR-gerichtete IgA-Antikörper beeinflussen die Tumorzellviabilität	80
3.2.2 Indirekte Wirkmechanismen der EGFR-gerichteten IgA-Antikörper	82
3.2.3. Nachweis der Spezifität der EGFR-gerichteten IgA-Antikörper	91
3.3. Der Einfluss von EGFR-gerichteten IgA-Antikörpern auf die Komplementaktivierung	93
3.3.1. IgA-Antikörper aktivieren kein Komplement	93
3.3.2. EGFR-gerichtete IgA-Antikörper inhibieren die Komplementaktivierung	94
3.3.3. Spezifität der beobachteten Effekte	97
3.3.4. EGFR-gerichtete IgA-Antikörper beeinflussen die Opsonisierung und C1q-Deposition	99
3.3.5. Komplementinhibition durch dimeres 225-IgA1	100
4. Diskussion	102
4.1. Rekombinante Herstellung der EGFR-gerichteten IgA-Antikörper	102
4.2. Etablierung eines geeigneten Produktionssystems	102
4.3. Optimierung einer Aufreinigungsstrategie für dimeres IgA1	103
4.4. Funktionelle Eigenschaften der EGFR-gerichteten IgA-Antikörper	105
4.5. Funktionelle Charakterisierung von dimerem IgA1 – Die Rolle der Valenz	108
4.6. Transzytose von dimerem IgA – Etablierung des <i>in vitro</i>-Testsystems	110
4.7. Komplementinhibition durch IgA-Antikörper	112
4.8. Ausblick	113
5. Zusammenfassung	114
6. Summary	116
7. Referenzen	117
8. Anhang	135
8.1. Verwendete Chemikalien	136
8.2. Verwendete Kits	136
8.3. Verwendete Lösungen	136
8.4. Verwendete Antikörper	138
8.5. Verwendete Geräte, Säulen, Gebrauchsmaterialien	139
8.6. Verwendete Software	140
Abkürzungsverzeichnis	141
Veröffentlichungen	146
Curriculum Vitae	147
Eidesstattliche Erklärung	148
Danksagung	149

1. Einleitung

1.1. Epitheliale Tumorerkrankungen

Zu den häufigsten epithelialen Tumorerkrankungen gehören Karzinome der gastrointestinalen, bronchialen und urogenitalen Gewebe, der Drüseneithelien und der Haut. Alleine in Europa wurden im Jahr 2006 790.748 Neuerkrankungen mit Karzinomen epithelialer Gewebe und darüber hinaus 363.545 Todesfälle aufgrund dieser Erkrankungen registriert. Die Entwicklung von therapeutisch wirksamen Substanzen zur Behandlung dieser Krankheiten stellt in der medizinischen Forschung ein aktuelles Ziel dar (European Cancer Observatorium Bericht 2006). Die Pathogenese der angesprochenen Karzinome beginnt zumeist mit der Transformation epithelialer Zellen (World Cancer Report, IARC 2008). Für die Entstehung von bösartigen Tumoren bedarf es meist mehrerer genetischer und molekularer Veränderungen. Eine Überexpression des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR, Epidermal Growth Factor-Receptor) wird dabei häufig beobachtet (Cunningham 2004, Chung 2006, Kurai 2007, Rivera 2008).

1.2. Der Epidermale Wachstumsfaktor Rezeptor (EGFR)

1.2.1. Die Familie der Rezeptoren epidermaler Wachstumsfaktoren

Durch molekularbiologische Forschungen über die ursächlichen genetischen und proteasomalen Veränderungen bei der Genese und Progression der Karzinome konnte der EGFR als Zielstruktur identifiziert werden (Ciardiello 2008). Der EGFR gehört zur Familie von Rezeptoren für epidermale Wachstumsfaktoren, die wiederum zur Klasse der Rezeptortyrosinkinasen gehören. Zu dieser Familie der humanen epidermalen Rezeptoren (HER) gehören insgesamt vier Mitglieder mit der Bezeichnung HER 1 (EGFR), HER 2, HER 3 und HER 4 (Abb. 1). Mit Ausnahme des dritten Mitglieds dieser Familie verfügen diese Rezeptoren über eine intrazelluläre Tyrosinkinasedomäne (Guy 1994). Es existieren mehrere Liganden für diese Rezeptoren. Die meisten wurden bisher für den EGFR (HER 1) beschrieben: Zu dessen Liganden gehört zum einen der epidermale Wachstumsfaktor (EGF), mit dem der EGFR eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung von Epithelien spielt. So konnte mit Hilfe von EGFR-defizienten Mäusen nachgewiesen werden, dass ein Mangel an EGFR starke Schäden und Fehlbildungen der gastrointestinalen, dermatologischen, respiratorischen und nervalen Systeme und letzten Endes eine sehr frühe Letalität zu Folge hat (Miettinen 1995). Zum anderen

zählen der Tumorwachstumsfaktor alpha (Tumor Growth Factor, TGF α), Amphiregulin, β -Cellulin, HB-EGF und Epiregulin zu den Liganden des EGFR. Die letzten beiden sind auch Liganden von HER 4. HER 4 und HER 3 haben Neureguline (NRG) als Liganden. HER 2 ist das einzige Mitglied in dieser Familie, das keine Ligandenbindungsdomäne besitzt.

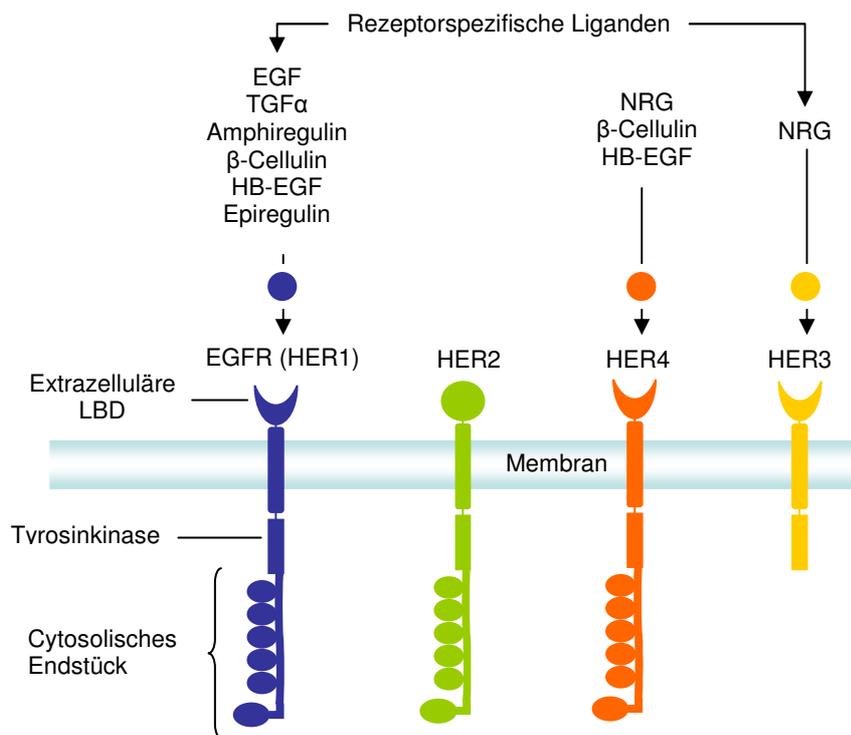


Abbildung 1: Die vier Mitglieder der Familie von Rezeptoren für epidermale Wachstumsfaktoren. Drei Mitglieder, HER 1, 2 und 4, verfügen über eine intakte intrazelluläre Tyrosinkinasedomäne und ein cytosolisches Endstück über die eine intrazelluläre Signalkaskade aktiviert wird. Die meisten Liganden wurden bisher für das erste Mitglied, den EGFR (HER 1) beschrieben. Des Weiteren gibt es Liganden für HER 3 und 4. HER 2 verfügt über keine extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne (LBD). Tumor Wachstumsfaktor α (Tumor Growth Faktor α (TGF α)), Heparin-bindender epidermaler Wachstumsfaktor (HB-EGF, Heparin-binding Epidermal Growth Factor), Neureguline (NRG). (angelehnt an Ciardiello 2008)

1.2.2. Physiologische Bedeutung der EGFR-Rezeptoren

Die Aktivierung der Rezeptoren erfolgt über eine Liganden-induzierte Dimerisierung. Die Bindung des Liganden bewirkt bei der extrazellulären Domäne eine Konformationsänderung. Die entspannte Konformation des Rezeptors wird dabei durch den Liganden in eine unentspannte Konformation überführt, welche durch den Liganden stabilisiert wird (Garrett 2002, Ogiso 2002). Diese Konformationsänderung

ermöglicht die Dimerisierung des Rezeptors. Dadurch können die intrazellulären Tyrosinkinasedomänen die Tyrosinreste (insgesamt 10) im Rahmen einer gegenseitigen Transautophosphorylierung aktivieren (Abb. 2, Lammerts van Bueren 2008).

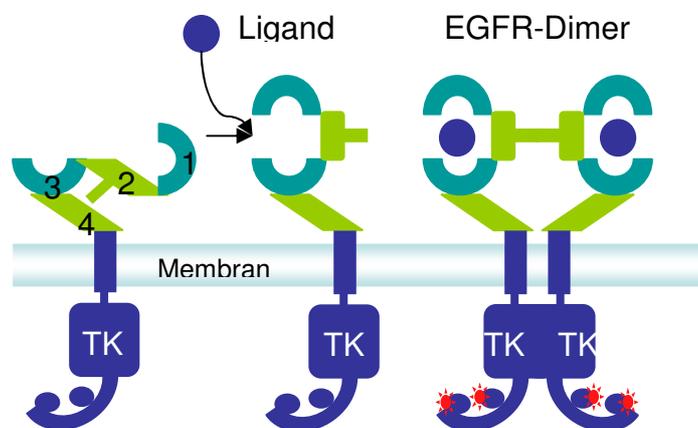


Abbildung 2: Die Aktivierung des EGFR durch dessen Liganden EGF. Die Bindung des EGF bewirkt eine Konformationsänderung des Rezeptors. Der Ligand stabilisiert die unentspannte Konformation des Rezeptors und ermöglicht so die Dimerisierung. Dadurch können die intrazellulären Tyrosinkinasedomänen die Tyrosinreste des cytosolischen Endstücks transautophosphorylieren. Damit können verschiedene intrazelluläre Signalwege initiiert werden. (angelehnt an Lammerts van Bueren 2008).

In einer aktuellen Studie wurde im Kontrast zur allgemeinen Meinung gezeigt, dass es sich bei den Dimeren des EGFR um vorgeformte Komplexe handelt, die in Abhängigkeit des kortikalen Actinnetzwerkes und der Expression des Rezeptors gebildet werden. Der Ligand EGF würde somit nicht die Dimerisierung induzieren, sondern nur die Transautophosphorylierung und damit die Signaltransduktion (Chung 2010). Neben dem Beispiel der Homodimerisierung, bei der zwei gleiche Mitglieder der HER-Familie interagieren, sind auch Heterodimerisierungen möglich. Daraus ergeben sich verschiedene Interaktionsmöglichkeiten, die unterschiedliche physiologische Rollen wahrnehmen (Earp 2003). Die Homodimerisierung des EGFR und die Heterodimerisierung von EGFR und HER 2 und die Aktivierung durch EGF führen zu einer verstärkten Proliferation, während die Heterodimerisierung von HER 2 und HER 4 und die Aktivierung mittels Heregulin die Zelldifferenzierung induzieren. Des Weiteren ist bekannt, dass EGFR eine physiologische Rolle bei der Entwicklung von Gangepithelien besitzt, während HER 2 und 4 bei der alveolaren Differenzierung beteiligt sind (Jones 1999). Die Heterodimerisierung oder gar Heterotetramerisierung

ist kein seltener Vorgang, sondern durch die verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten von Liganden und Rezeptoren werden die unterschiedlichen Zellvorgänge, z.B. Differenzierung, Proliferation, Adhäsion, die von zentraler Bedeutung bei der Ausbildung von Epithelzellen sind, konzentriert reguliert (Johanessen 2001, Sebastian 2006). Dabei führen die unterschiedlichen Interaktionen auch zu unterschiedlichen Phosphorylierungen verschiedener Tyrosinreste der intrazellulären Domäne, wodurch unterschiedliche Signalwege intrazellulär angeschaltet werden. Für Homo- und Heterodimere des EGFR ist die Aktivierung von Mitogen-aktivierte-Kinasen-(MAP)-, Phosphoinositol-3-Kinase-(PI3K)- und Signaltransduktoren-und-Aktivatoren-der-Transkription-(STAT)-abhängigen Signalwegen beschrieben (Ciardiello 2008, Baselga 2001, Abb. 3).

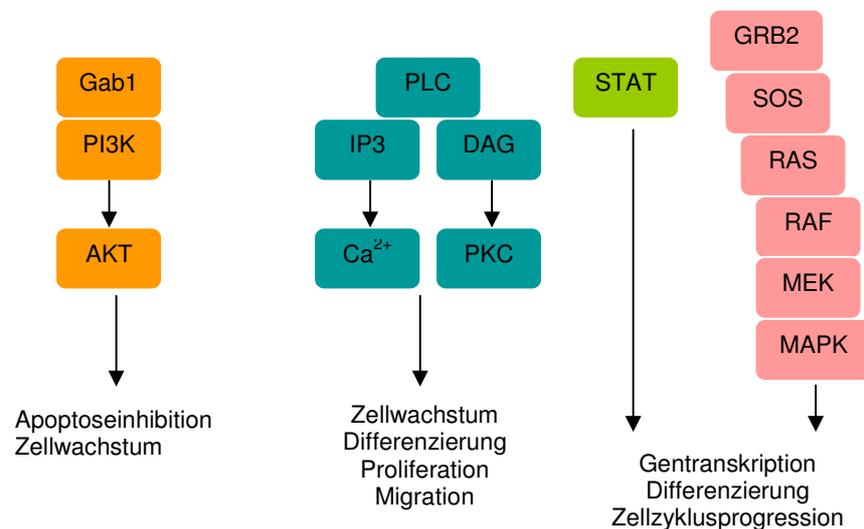


Abbildung 3: Die Phosphorylierung des EGFR bewirkt eine intrazelluläre Signaltransduktion über verschiedener Signalwege. In der Literatur beschrieben ist die Aktivierung eines PI3K-abhängigen Signalweges, der vor allem die Apoptose inhibiert und das Zellwachstum anregt. Des Weiteren werden Phospholipase-abhängige Signalwege, wie der PLC, induziert, mit der Folge von gesteigertem Zellwachstum, Differenzierung, Proliferation und Migration. Dagegen führt die Aktivierung der STAT- und MAP-Kinase-abhängigen zu einer gesteigerten Genexpression, z.B. des VEGF und von MMPs, Zelldifferenzierung und zur Zellzyklusprogression. (angelehnt an Ciardiello 2008, Lee 2009)

Über den PI3K-Weg wird AKT aktiviert, dass zum einen zellzyklusinhibitorische Proteine inhibiert und zum anderen apoptosehemmende Faktoren aktiviert (Samaga 2009). Das Protein Grb2 ist ein Adapterprotein, das über die SH2-Domäne mit dem phosphorylierten EGFR interagiert und über die Nukleotidaustauschfunktion die Guanosintriphosphat-(GTP)ase Ras aktiviert. Über die Grb2-Ras-abhängige

Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges wird die Transkription und Translation von Genen, zum Beispiel von Cyclin-abhängigen Kinasen, angeregt, die für das Wachstum und die Differenzierung der Zelle von Bedeutung sind (Tsui 2009). Die Phosphorylierung von STAT-Proteinen durch den aktivierten EGFR induziert deren Dimerisierung (Squarize 2006). Die so aktivierten STAT-Proteine werden in den Zellkern transportiert und aktivieren direkt die Transkription von Genen für zelluläre Prozesse wie Zellzyklusprogression, Apoptoseinhibition, Differenzierung, Zellwachstum, Proliferation, z.B. die Gene für Cyclin-abhängige-Kinasen (Samaga 2009, Abb. 3). Des Weiteren ist die Aktivierung verschiedener Phospholipasen (PL), darunter PLC γ 1 (Wu 2009), durch EGFR beschrieben, die besonders wachstumsfördernde und proliferative Wirkungen haben.

1.2.3. Das Tumorantigen EGFR

Bei der Karzinogenese von Epithelien wird häufig eine Überexpression des EGFR beobachtet (Sebastian 2006, Rivera 2008), die beim Fortschreiten der Karzinogenese und Metastasierung weiter ansteigen kann (Ozawa 1989). Durch die Überexpression dieses Mitglieds der EGFR-Familie wird das Gleichgewicht der Homo- und Heterodimerisierung in Richtung vermehrter Homo- und Heterodimere des EGFR verschoben, unter denen vor allem das EGFR- und HER 2-Heterodimer für seine starke Signaltransduktion bekannt ist (Karunagaran 1996). Die dadurch gesteigerte Aktivierung der intrazellulären Signalwege hat eine deutlich erhöhte Proliferation und die Inhibition der Apoptose zur Folge (Kloth 2003, Andl 2004). Die Überexpression des EGFR führt zu einer gesteigerten Expression des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors und von Metalloproteinasen. Beide führen zu einer intensivierten Angiogenese und Metastasierung (Ferrara 1999). Des Weiteren werden verstärkt Phospholipase-C γ abhängige Signalwege aktiviert, welche die Reorganisation des Cytoskeletts und damit die Metastasierung des Tumors bewirken (Wells 1999). Die Beteiligung der EGFR-Signalwege an den malignen Transformationen von Epithelien wird bereits seit den Achtzigern diskutiert (Miller 1995).

Neben der Überexpression und erhöhten Anzahl an Genkopien werden im Zusammenhang mit dem Tumorantigen EGFR auch Mutationen in Form von Deletionen und Insertionen in der Aminosäuresequenz des EGFR beschrieben (Frederick 2000, Okabe 2007, Peipp 2008). Hierbei wurden insbesondere bei

Glioblastomen, Kolonkarzinomen und nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen sowohl Mutationen in der Tyrosinkinasedomäne als auch in den extrazellulären Domänen des Proteins nachgewiesen. Unter diesen führen vor allem die EGFR-Variante III mit einer Deletion in der Ligandenbindungsdomäne und die T790M-Mutation der Tyrosinkinase zu einem konstitutiven Anschalten intrazellulärer Signalwege (Mukherjee 2009, Suda 2009).

1.2.4. Therapeutische Ansätze

Der EGFR stellt eine geeignete Zielstruktur für die therapeutische Behandlung solider Tumoren epithelialer Gewebe dar. Die Behandlung von EGFR-positiven Tumoren basiert auf zwei unterschiedlichen Arten von Substanzen: Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) und monoklonalen Antikörper. Das Prinzip dieser TKIs beruht auf der Hemmung der ATP-Bindungsstelle der Tyrosinkinasedomäne des Rezeptors (Abb. 4, Ciardiello 2008). Durch die Hemmung werden die Autophosphorylierung und Induktion der Signaltransduktion blockiert. Einige therapeutisch oder in klinischen Versuchsreihen angewandte TKIs (Zielstruktur) sind Gefinitib/Iressa (EGFR), Erlotinib/Tarceva (EGFR), Canertinib (pan EGFR) und Lapatinib (EGFR, HER 2).

Eine weitere Strategie ist die Verwendung von monoklonalen Antikörpern, die gegen die extrazelluläre Domäne des EGFR gerichtet sind. Durch die Verdrängung des Liganden oder die Kreuzvernetzung des EGFR hemmen diese intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden mit der Folge, dass der Zellzyklus arretiert, das Wachstum inhibiert und Apoptose induziert werden (Ciardiello 2008, Martinelli 2009, Abb. 4). Es befinden sich mehrere spezifische Antikörper in klinischen Studien und/oder Therapien (Weiner 2009, Martinelli 2009).

Zugelassene Antikörper sind Cetuximab (Erbix, Merck; Weiner 2008, Ciardiello 2008), für die Behandlung von Dickdarntumoren und Plattenepithelkarzinomen des Kopfes und Halses sowie Panitumumab (Vectibix, Amgen; Ciardiello 2008) für die Behandlung des metastasierten Kolon- oder Rektumkarzinoms. Zwei weitere Antikörper befinden sich in klinischen Studien (Rivera 2008): Nimotuzumab (TheraCim, YM Biosciences) für die Behandlung des metastasierenden Kolorektalkarzinoms und Zalutumumab (HuMax-EGFR, Genmab) für die Behandlung von Kopf- und Halstumoren und dem nichtkleinzelligen Bronchialtumor und Necitumumab (IMC-11F8) für die Behandlung des nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms. Diese Antikörper sind alle vom IgG-Isotyp der Immunglobuline:

Nimotuzumab ist ein humanisierter IgG1-Antikörper, Panitumumab entspricht dem humanen IgG2-Allotyp, Zalutumumab und Necitumumab dem humanen IgG1-Isotyp und Cetuximab ist eine Chimäre aus murinen variablen Ketten und schweren Ketten des humanen IgG1. Aufgrund der zunehmenden Bedeutung der Antikörper-basierten Immuntherapie gegen EGFR-überexprimierende Tumore, welche auch einen Kernpunkt der vorliegenden Arbeit darstellt, werden die Antikörper und ihre Wirkmechanismen im Folgenden ausführlicher behandelt (Tab. 1, Abb. 4).

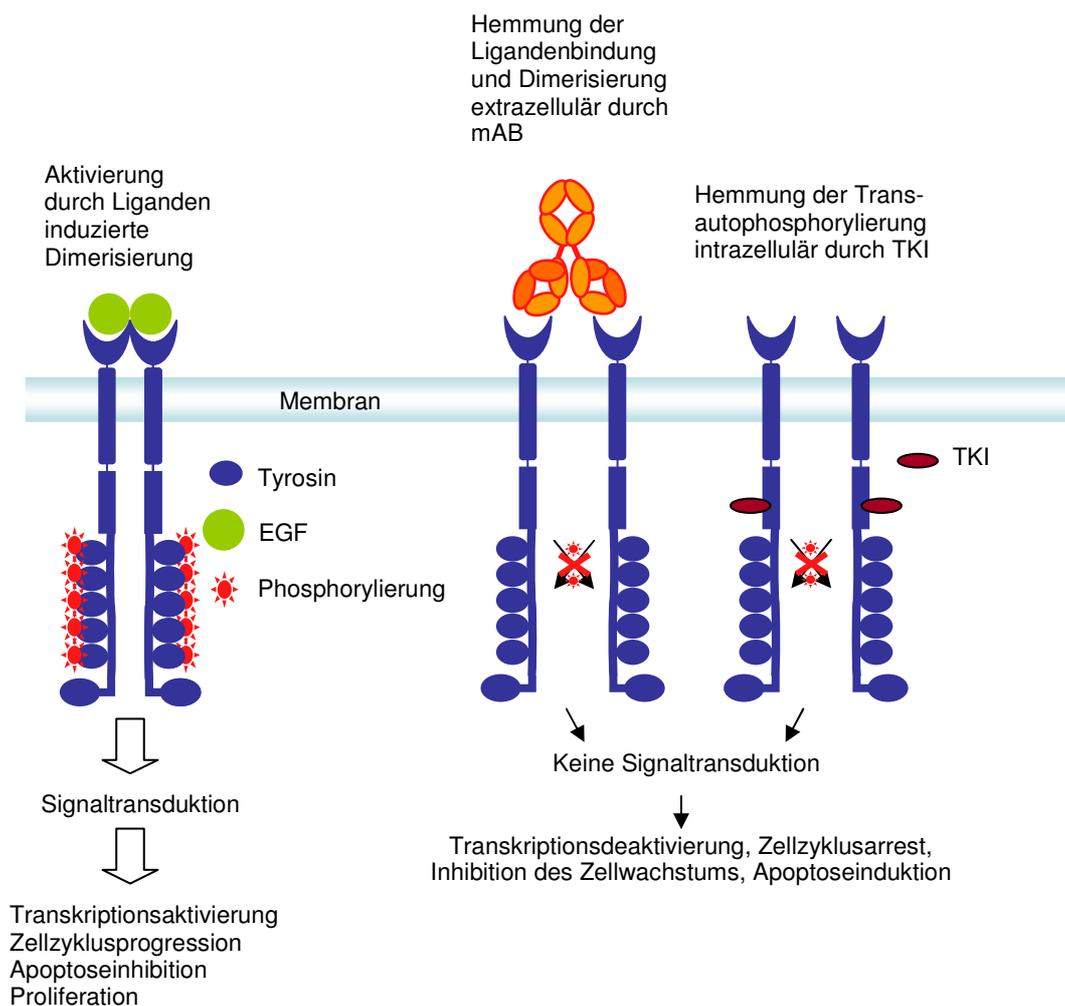


Abbildung 4: Prinzip der Wirkung von monoklonalen Antikörpern und TKI. Monoklonale Antikörper (mAB) binden den EGFR und verhindern die Liganden-induzierte Dimerisierung des Rezeptors. Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) hemmen intrazellulär die Tyrosinkinasedomäne. In beiden Fällen wird die Aktivierung des Rezeptors durch Transautophosphorylierung inhibiert, wodurch die Zelle im Wachstum und in der Zellzyklusprogression gehemmt und Apoptose induziert werden. (angelehnt an Peipp 2008).

Tabelle 1: Funktionelle und pharmakologische Eigenschaften EGFR-gerichteter Therapeutika

(abgewandelt von Ciardiello 2008)

Eigenschaft	Monoklonale Antikörper	Tyrosinkinaseinhibitoren
Verabreichung	Intravenös (zwei-/ einmal wöchentlich)	Oral (täglich)
Struktur	Rekombinante Immunglobuline (150-180 kDa)	Niedrig-molekulare Komponenten (400-600 Da)
Spezifität	Spezifisch für EGFR	Je nach TKI spezifisch für EGFR, dessen Familie oder Wachstumsfaktorrezeptoren
Mechanismus der Interferenz	Binden Ligandenbindungsdomäne, Blockieren Bindung des Liganden und Dimerisierung	Verhindern ATP-Bindung an Tyrosinkinasedomäne und damit die Autophosphorylierung, reversibel und irreversibel
Zelluläre Effekte	Hemmen Tumorzell-Proliferation (G1 Zellzyklus-arrest), VEGF-Produktion (Angiogenese), Tumor induzierte Angiogenese, verstärken Wirkung von zytotoxischen Mitteln und der Radiotherapie	Hemmen Tumorzell-Proliferation (G1 Zellzyklus-arrest), VEGF-Produktion (Angiogenese), Tumor induzierte Angiogenese, verstärken Wirkung von zytotoxischen Mitteln und der Radiotherapie
Bewirkung der Internalisierung, Regulierung und Degradation des EGFR	ja	Nein (nur bei irreversibler Hemmung der TK)
Hemmung der intrazellulären EGFR Signalwege	ja	Ja
Wirkung gegen EGFR Mutanten	Ja, aber abhängig von der Mutation	Ja, für die meisten Mutanten Nein, für T790M-Mutante
Aktivierung des Immunsystems	Ja, Antikörper vermitteln Antikörper abhängige Zytotoxizität durch Rekrutierung von Effektorzellen ± Komplement	Nein

Der Erfolg der Therapie kann durch Mutationen des EGFR oder von KRAS, einer GTPase der intrazellulären Signalkaskade (Abb.6), negativ beeinflusst werden (Pao 2005, Doody 2007, Allegra 2009, Hammerman 2009). Durch Mutationen in diesen Proteinen wird die intrazelluläre Signalkaskade konstitutiv aktiviert, wodurch die

Wirkung der TKIs und monoklonalen Antikörpern teilweise oder ganz aufgehoben werden kann. Gegenwärtige Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigen hingegen, dass trotz Mutation in der EGFR-Tyrosinkinase oder in KRAS insbesondere durch die indirekten Effektmechanismen monoklonaler Antikörper eine Wirkung auf Tumorzellen erzielt werden kann (Peipp 2008, Schlaeth 2010).

1.3. Wirkmechanismen von Antikörpern

1.3.1. Antikörperisotypen

Im humanen Organismus werden unterschiedliche Antikörpermoleküle exprimiert, die sich in ihrem strukturellen Aufbau ähneln, aber in einigen Details grundlegende Unterschiede aufweisen und daher auch unterschiedliche Funktionen wahrnehmen. Die fünf verschiedenen Isotypvarianten der Immunglobuline (Ig) sind IgG, IgM, IgD, IgA und IgE (Tab. 2). Für die Isotypen IgG und IgA sind darüber hinaus vier bzw. zwei Subklassen bekannt. Die einzelnen Isotypen unterscheiden sich in der Anzahl und Verknüpfung der Disulfidbrücken und in der Anzahl der konstanten Domänen. So sind IgM- und IgE-Antikörper die einzigen Isotypen, die über vier konstante Domänen in der schweren Kette verfügen. IgM kommt in seiner monomeren Form meist membranständig auf B-Zellen als Teil des B-Zell-Rezeptor-Komplexes vor, im Serum und in Sekreten findet sich die lösliche pentamere Form (970 kDa).

Tabelle 2: Die biochemischen Eigenschaften der wichtigsten menschlichen Immunglobuline (Janeway 2004, verändert)

	Immunglobulin									
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgM	IgA1	IgA2 m1	IgA2 m2	IgD	IgE
Struktur										
schwere Kette	γ1	γ2	γ3	γ4	μ	α1	α2	α2	δ	ε
Molekulargewicht [kDa]	146	146	165	146	194	160	160	160	184	188
Serumspiegel [mg/ml]	9	3	1	0,5	1,5	3,0	0,5	0,5	0,03	5x10 ⁻⁵
Halbwertszeit [Tage]	21	20	7	21	10	6	6	6	3	2

Da in der vorliegenden Arbeit rekombinant hergestellte IgA-Antikörper miteinander verglichen und im Vergleich zu kommerziell erhältlichen IgG1-Antikörpern charakterisiert wurden, konzentriert sich die Einleitung auf diese Immunglobulin-Isotypen.

1.3.2. Die Immunglobuline vom IgG1- und IgA1-Isotyp

Beim direkten Vergleich der Strukturen von IgG1 und IgA1 ist ein ähnlicher Aufbau aus leichten und schweren Ketten bzw. aus variablen und konstanten Domänen zu erkennen (Abb. 5).

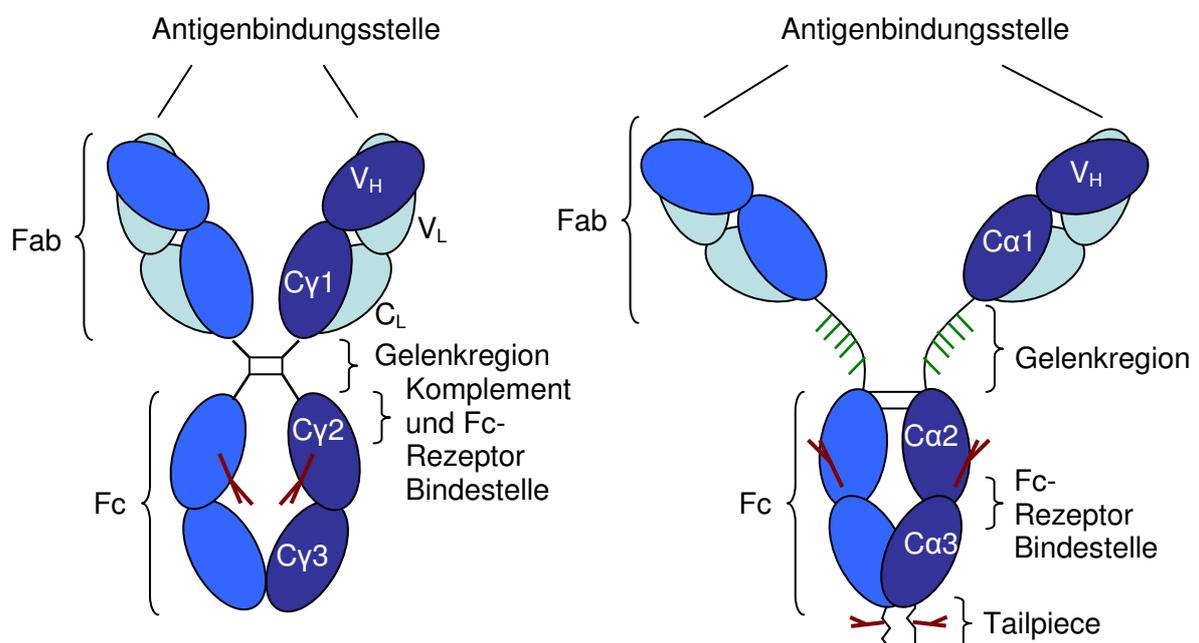


Abbildung 5: Vergleich des strukturellen Aufbaus der Immunglobulinisotypen IgG1 (links) und IgA1 (rechts). Beide Antikörperformate bestehen aus der gleichen Anzahl an variablen und konstanten Domänen (V und C) der leichten und schweren Ketten (L und H). Der IgA1 verfügt über zwei Verlängerungen um 13 Aminosäuren in der Gelenkregion und 18 Aminosäuren am C-terminalen Ende, der Tailpiece-Region (Woof 2006). Fab = Antigen bindendes Fragment, Fc = Fragment crystallizable, in Rot Stickstoff-(N-) Glykane, in Grün O-Glykane.

Beide Isotypen kennzeichnen sich durch einen Fab-Teil (Fab, fragment antigen binding), bestehend aus den variablen Domänen der leichten (V_L) und schweren (C_L) Ketten sowie der konstanten Region der leichten (V_H) und der ersten konstanten Domäne der schweren Ketten (C_H1). Der Fc-Teil (Fc, fragment crystallizable) besteht aus zwei konstanten Domänen der schweren Ketten (C_H2 und 3). Beide Teile verbindet eine Gelenkregion. Hierbei gibt es deutliche Unterschiede zwischen IgG1-

und IgA1-Antikörpern. Die Gelenkregion von IgG1-Antikörpern ist zwar sehr flexibel aber doch deutlich kürzer als die des IgA1. Die Bindestellen für Komplementproteine und/oder Fc-Rezeptoren befinden sich bei beiden Isotypen im Fc-Teil. Die genauen Positionen für die C1q-Bindestelle der IgG1-Antikörper wurden bereits ausfindig gemacht (D270, K322, P329, P331, K326, E333, Idusogie 2001). IgA-Antikörper verfügen im Gegensatz zu IgG1-Antikörpern über einen verlängerten C-Terminus, diese Region nennt sich Tailpiece (Woof 2006).

1.3.3. Strukturvariationen der IgA-Immunglobuline

Es existieren zwei Varianten des IgA-Isotyps, IgA1 und IgA2, wobei letztere in zwei verschiedenen Allotypen vorliegt. Auch IgA2-Antikörper haben eine ähnliche Struktur aus leichten und schweren Ketten wie IgG1-Antikörper (Woof and Kerr 2006). Die einzelnen IgA-Iso- und -Allotypen unterscheiden sich in Struktur und Aufbau (Abb. 6, Kerr 1990, Furtado 2004, Yoo 2005, Woof 2006, Bonner 2008).

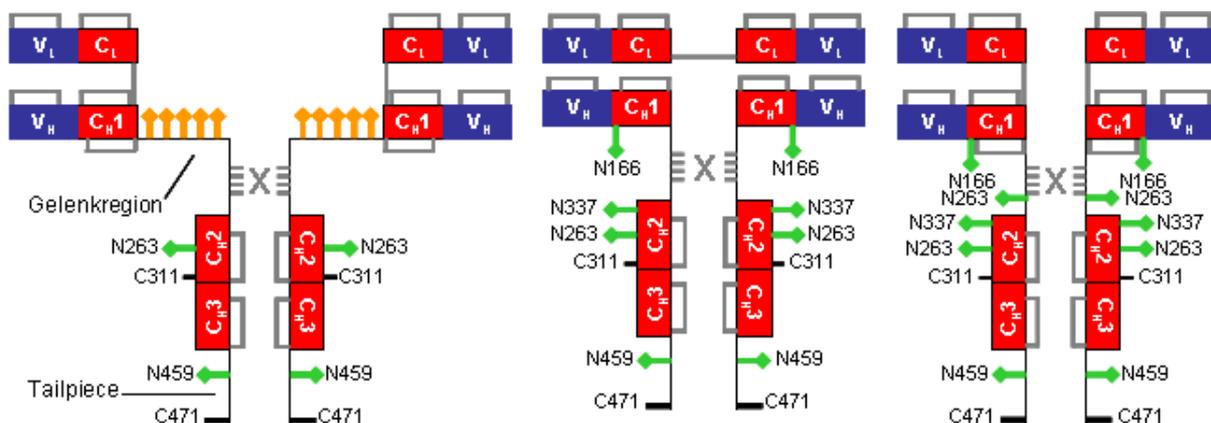


Abbildung 6: Schematische Darstellung der IgA-Varianten: IgA1 (links), IgA2m(1) (Mitte) und IgA2m(2) (rechts). In Grün N-Glykosylierungen, in Orange O-Glykosylierungen, in Grau Disulphidbrücken (Quelle: Furtado 2004 verändert).

Einer der wichtigen Unterschiede zwischen IgA1 und IgA2 ist die um 13 Aminosäuren verlängerte Gelenkregion des IgA1, mit bis zu 5 potentiell O-glykosylierbaren Serinen und Threoninen (Abb. 6, Woof and Kerr 2006, Furtado 2004). Diese verlängerte Gelenkregion bedingt eine erhöhte Anfälligkeit für Proteasen (Kerr 1990) und spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung einer IgA-verursachten Nephritis (IgAN, Novak 2008, Donadio 2002). Die Verlängerung der Gelenkregion hat eine Wirkung auf die Funktionalität der IgA-Isotypen, da sie die Flexibilität der Moleküle beeinflusst

(Woof 2005). Aufgrund der längeren Gelenkregion besitzt der IgA1-Isotyp eine größere Flexibilität und ist damit eher für flexiblere Zielstrukturen geeignet als der IgA2. Mit der kurzen Gelenkregion besitzt der IgA2-Isotyp eine starrere T-förmige Struktur, und ist damit für repetitive starre Zielstrukturen geeignet (Furtado 2004).

Im Falle von IgA2 existieren zwei allotypische Varianten: der bei Kaukasiern vorkommende Allotyp IgA2m(1) und der bei Afrikanern und Asiaten dominierende Allotyp IgA2m(2) (Abb. 6). Die beiden Allotypen des IgA2 unterscheiden sich im Wesentlichen in der Verknüpfung der schweren und leichten Ketten. Während beim IgA2m(1) nur Homodimere über Disulfidbrücken verknüpft werden – je 2 leichte und je 2 schwere Ketten – und diese Homodimere nur über nichtkovalente Verbindungen zusammengehalten werden, sind beim Allotyp IgA2m(2) die leichten und schweren Ketten, ähnlich zum IgA1, kovalent miteinander verknüpft (Woof and Kerr 2006).

1.3.4. Glykosylierung von IgG1- und IgA-Antikörpern

Die verlängerte Gelenkregion des IgA1 besitzt fünf Positionen für Sauerstoff-(O-) Glykosylierungen (Novak 2008). Bei der Entwicklung der IgA-Nephropathie sind aberrante Glykosylierungsmuster in der Gelenkregion des IgA1 als ursächlich entdeckt worden. Eine Hypogalaktosylierung in dieser Region führt zur Bildung von selbstreaktiven IgG1-Antikörpern, wodurch sich zirkulierende Immunkomplexe aus IgA1- und IgG1-Antikörpern formen. Diese reichern sich in den Nieren an und verursachen die Entzündung des Gewebes (Novak 2008).

Im Gegensatz zum IgA1- besitzt der IgA2-Isotyp keine verlängerte Gelenkregion und damit auch keine O-Glykane. Dafür aber eine erhöhte Anzahl an N-Glykosylierungen. Während der IgA1-Isotyp zwei Positionen für N-Glykosylierungen in der C_H2-Domäne und der Position 459 besitzt, existieren beim IgA2-Isotyp zwei weitere N-Glykosylierungspositionen in der C_H1- und der C_H2-Region (Abb. 6, Woof and Mestecky 2005, Furtado 2004). Damit sind IgA-Antikörper im Allgemeinen stärker glykosyliert als IgG-Antikörper. Darüber hinaus sind sie weitaus heterogener glykosyliert (Woof and Mestecky 2005). IgG1-Antikörper besitzen nur eine N-Glykosylierungsstelle in der C_γ2-Region. Diese ist im Gegensatz zu den Glykosylierungen der IgA-Antikörper wichtig für die Aufrechterhaltung der Struktur und der funktionellen Eigenschaften (Gomes 2008, Peipp 2008). Ein weiterer Unterschied zwischen den Allotypen IgA2m(1) und IgA2m(2) besteht in der Anzahl

der N-Glykane: Der Allotyp IgA2m(1) besitzt 8 N-Glykane, wogegen der Allotyp IgA2m(2) eine weitere N-Glykosylierung an Position 263 aufweist. Damit ist dieser IgA2 Allotyp die am stärksten glykosylierte IgA-Variante.

1.3.5. Polymere Immunglobulin Spezies

Allen IgA-Isotypen und -Allotypen gemein ist die Tailpiece-Region. Dabei handelt es sich um eine Verlängerung von 18 Aminosäuren am C-terminalen Ende, die nur bei IgA- und IgM-Antikörpern zu finden ist (Woof and Kerr, 2006, Furtado 2004). Von zentraler Bedeutung ist hierbei die 17. Aminosäure, das Cystein 471. In den IgA-produzierenden Plasmazellen der Lamina Propria werden die monomeren IgA-Antikörper über dieses Cystein mit einem weiteren Protein, der J-Kette (joining chain) durch die Bildung von Disulfidbrücken kovalent verknüpft und dadurch dimerisiert (Bonner 2007 and 2008; Lewis 2005, Abb. 7 A).

Dieser Prozess findet bereits im endoplasmatischen Retikulum statt (DellaCorte 1973; Roth 1981). Höher polymere Formen, wie Tetramere, sind unter der Beteiligung einer weiteren J-Kette ebenfalls möglich, kommen aber sehr selten vor. Die J-Kette wird entweder in polymeres IgA eingebaut, oder intrazellulär abgebaut (Brandtzaeg 1975). Durch den Zusammenbau der beiden IgA-Monomere und der J-Kette entsteht ein fast planares Molekül, das vier mögliche Bindungsstellen für das Antigen und den IgA-Fc-Rezeptor Fc α RI besitzt (Bonner 2009). Die IgA-Dimere werden nach ihrer Sekretion aus den Plasmazellen von dem polymeren Immunglobulin Rezeptor (pIgR) auf der basolateralen Seite von Epithelzellen erkannt. An dieser Stelle wird die entscheidende Rolle der J-Kette offensichtlich: Die J-Kette bindet an den pIgR und initiiert damit die Bindung des dimeren IgA an den pIgR (Johansen 1999, 2000 and 2001; Natvig 1997). Es erfolgt eine kovalente Verknüpfung mit der extrazellulären Domäne des pIgR, der sogenannten sekretorischen Komponente (SC). Dabei wird eine Disulfidbrücke zwischen dem Cystein 311 in der C_H2-Region eines IgA-Monomers und dem Cystein 502 der D5-Domäne der SC gebildet (Abb. 7, Bonner 2008, Krugmann 1997; Sorensen 2000). Das an den pIgR gebundene dimere IgA wird im Anschluss endozytotisch aufgenommen und über einen intrazellulären vesikulären Transport auf die apikale Seite transportiert (Brandtzaeg 1981). Nach diesem Prozess der Transzytose wird auf der apikalen Seite die SC durch membrangebundene oder luminale Proteasen vom Rezeptor abgespalten. Die SC bleibt mit dem Dimer verbunden und bildet mit

diesem das sekretorische IgA (SIgA, Brandtzaeg 1981, Kaetzel 2005, Lewis 2005, Bonner 2008, Abb. 7).

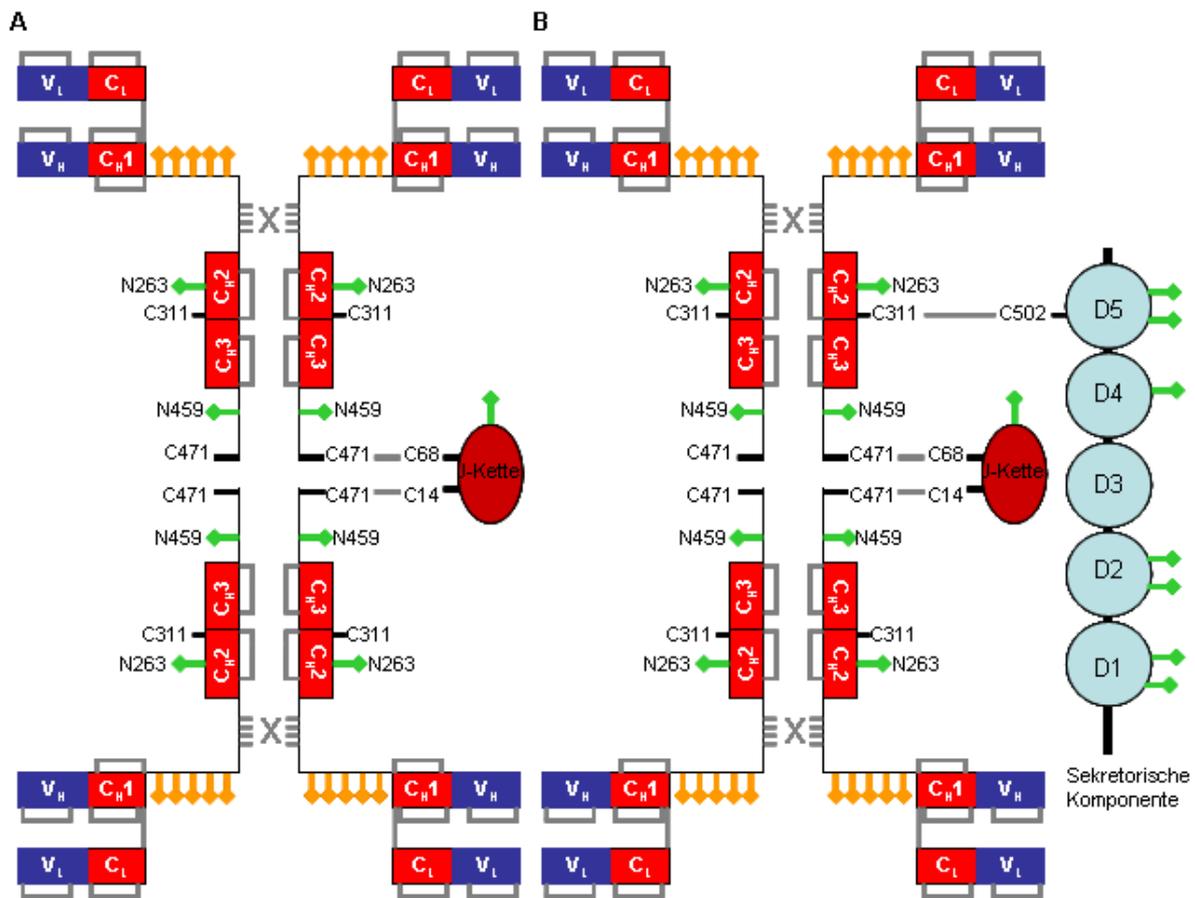


Abbildung 7: Schematische Darstellung von dimerem und sekretorischem IgA: (A) Die schematische Darstellung links verdeutlicht die Beteiligung des Tailpiece, des Cysteins 471 und der J-Kette an der Dimerisierung. (B) Die J-Kette ist essentiell für die Interaktion mit der sekretorischen Komponente (SC). Dadurch wird die Bildung einer Disulfidbrücke zwischen dem Cystein 311 der C_{H2}-Domäne einer der Monomere und dem Cystein 502 der D5-Domäne der SC. N-Glykosylierungen sind grün, O-Glykosylierungen orange und Disulphidbrücken grau markiert (modifiziert nach Bonner 2008 und Bonner 2009).

1.3.6. Fab-vermittelte Wirkmechanismen

Antikörper können über den Fab-Teil direkte Effekte vermittelt. Als direkte Wirkmechanismen monoklonaler Antikörper werden die Verdrängung des Liganden, die Induktion von Apoptose und die Inhibition von Signaltransduktionswegen beschrieben, die sich in einem verzögerten oder rückläufigen Tumorwachstum widerspiegeln (Cragg 1999). In einer Studie konnte gezeigt werden, dass Antikörper

gegen den EGFR in der Lage waren, Apoptose in Kolonkarzinomzellen zu induzieren (Liu 2000). Dabei konnten verschiedene Aspekte des programmierten Zelltodes, die Fragmentierung der DNA, die Spaltung des DNA-reparierenden Enzyms PARP und die Aktivierung der Caspasekaskade, nachgewiesen werden. Dafür mussten die Tumorzellen jedoch in Mangelmedium kultiviert werden. Die fehlende Aktivierung des PI3K-Weges und die dadurch fehlende Hemmung der apoptoseinduzierende Faktoren könnte die Induktion der Apoptose erklären (Kurai 2007). Neben der Induktion der Apoptose ist die Hemmung des Tumorzellwachstums eine weitere Fab-vermittelte Wirkung der Antikörper. Metabolisch aktive und wachsende Zellen sind in der Lage über Reduktasen Tetrazoliumsalze in Formazan umzusetzen. Diese Umwandlung kann mittels UV-Spektrometrie nachgewiesen werden. Mittels dieser Methode konnte für EGFR-gerichtete IgG-Antikörper bereits gezeigt werden, dass sie das Wachstum von Tumorzellen inhibieren können (Lammerts van Bueren 2008, Dechant 2007, Peipp 2008). Diese Studien konnten ebenfalls zeigen, dass die Antikörper die Autophosphorylierung des EGFR inhibieren konnten. Eine andere Publikation beschrieb die Induzierung des Zellzyklusarrests von humanen Plattenepithelkarzinomzellen durch einen monoklonalen EGFR-gerichteten Antikörper. Dabei konnten reduzierte Aktivitäten von Cyclin-abhängigen Kinasen, Enzymen die den Zellzyklus voranschreiten lassen, und die Expression von Zellzyklusinhibitoren gezeigt werden (Peng 1996, Kiyota 2000, Kurai 2007).

1.3.7. Fc-vermittelte Wirkmechanismen

Die Eigenschaften der konstante Domäne (Fc-Teil) beeinflussen die Fähigkeit der Antikörper mit bestimmten Rezeptoren und Proteinen zu interagieren und über diese indirekte Effektmechanismen zu induzieren. (Dechant 2007, 2008, Peipp 2009).

1.3.7.1. Fc-Rezeptor basierte Wirkmechanismen

Fc-Rezeptoren werden auf lymphatischen und myeloischen Zellen exprimiert. Über diese Rezeptoren rekrutieren Antikörper diese Zellen und aktivieren deren zytolytische, phagozytotische und immunmodulatorische Eigenschaften. Antikörper aus der Therapie von EGFR-überexprimierenden Tumoren sind vom IgG-Isotyp und können über drei Fc-Rezeptoren (CD16/FcγRIIIa, CD32/FcγRII, CD64/FcγRI) natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sowie Monozyten und Granulozyten aktivieren (Bibeau 2009). Für IgA-Antikörper ist beschrieben, dass sie über den IgA-Rezeptor

CD89 (FcαRI) hauptsächlich Granulozyten rekrutieren (Monteiro 2003). Der FcαRI wird von myeloischen Zellen, Granulozyten, Monozyten/Makrophagen sowie Subpopulationen von dendritischen Zellen, exprimiert (Monteiro 2003, van Egmond 2000). Die Fc-Rezeptoren CD16, CD64 und CD89 benötigen zur Expression und Signaltransduktion die Interaktion mit der FcRγ-Kette, die dann die bekannten Immunrezeptor-Tyrosin-basiertes-Aktivierungsmotif-(ITAM-) abhängigen Signalwege aktiviert (Morton 1995, Morton 1996). Die Interaktion von FcαRI und FcRγ-Kette ist besonders effizient (Bakema 2006), was zum Teil erklärt, warum IgA- im Vergleich zu IgG-Antikörpern besonders wirksam in der Induktion von Phagozytose, des „Respiratorischen Ausbruchs“, und der Degranulierung bei Granulozyten im Rahmen der Antikörper abhängigen zellulären Zytotoxizität (ADCC, antibody dependent cellular cytotoxicity) sind.

Tabelle 3: Fc-Rezeptoren, über die Antikörper Leukozyten rekrutieren können (Woof 2004, verändert).

Fc-Rezeptor (FcR)	Isoform	Spezifität für humanes Ig	Affinität	Zelluläre Verteilung
FcγRI (CD64)	FcγRIa	IgG1=3>4	hoch	Monozyten Makrophagen, Granulozyten (IFNγ, G-CSF stimuliert)
FcγRII (CD32)	FcγRIIa	IgG3≥1=2	niedrig	Monozyten Makrophagen, Neutrophile, Plättchen, Langerhans Zellen
	FcγRIIb	IgG3≥1>>2	niedrig	Monozyten Makrophagen, B Zellen
	FcγRIIc	-	niedrig	Monozyten Makrophagen, Neutrophile, B Zellen
FcγRIII (CD16)	FcγRIIIa	IgG1=3 >>>2=4	mittel	Makrophagen, NK Zellen, γδ T Zellen, manche Monozyten
	FcγRIIIb	IgG1=3 >>>2=4	niedrig	Mastzellen, Basophile, Langerhans Zellen, aktivierte Monozyten
FcαRI (CD89)	FcαRIa	Serum IgA1=2 SIgA1= SIgA2	mittel	Neutrophile, Monozyten, manche Makrophagen, Eosinophilen, Kupffer Zellen, manche dendritische Zellen (DC)

Die Interaktion mit dem Fc-Rezeptor ist zwischen IgG- und IgA-Antikörpern unterschiedlich (Pleass 1999, Otten 2004, Woof 2004). Während IgG-Antikörper von Fcγ-Rezeptoren in der oberen Cy2-Region und der unteren Gelenkregion in einer 1:1 Stöchiometrie gebunden werden, bindet FcαRI IgA-Antikörper in der Verbindungsregion zwischen der Ca2- und Ca3-Region in einer 2:1 Stöchiometrie. Dies bedeutet, dass zwei Moleküle des FcαRI mit einem Molekül IgA interagieren. Aufgrund der Bindungsregion mit dem Fc-Rezeptor müssen IgG-Antikörper eine geknickte Konformation annehmen, wogegen IgA-Antikörper aufgrund der näher am

C-Terminus gelegenen Bindungsregion ihre Konformation nicht ändern müssen (Woof 2004). IgA- und IgG-Antikörper rekrutieren über verschiedene Fc-Rezeptoren präferenziell unterschiedliche Effektorzellen und vermitteln die Lyse der Zielzellen prinzipiell über verschiedenen Mechanismen (Abb. 8).

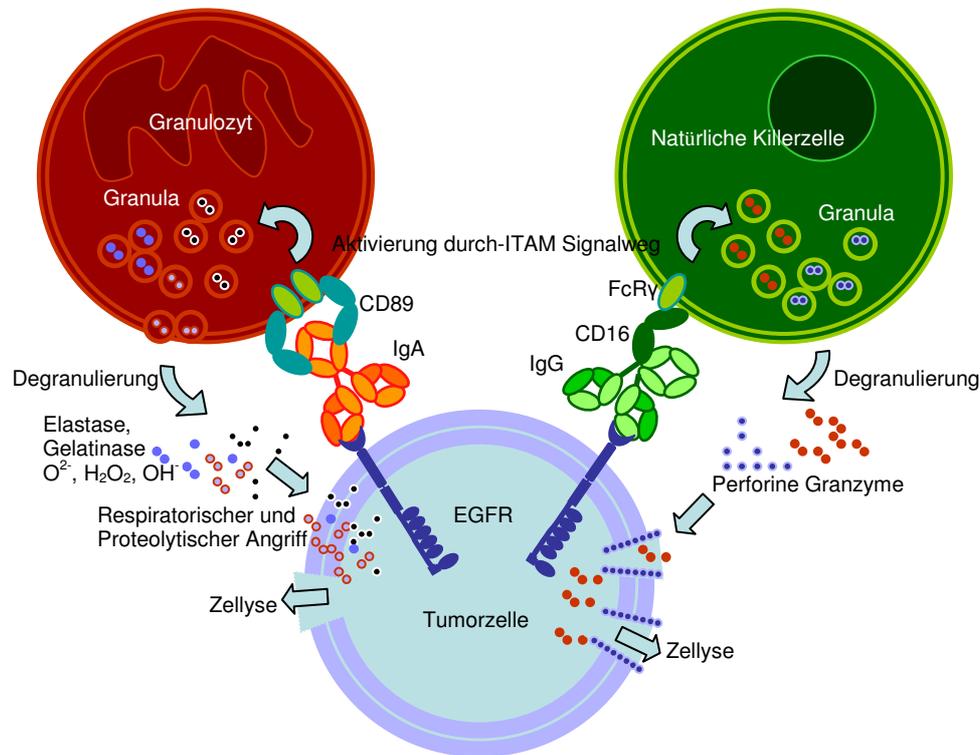


Abbildung 8: Vereinfachte Darstellung der Abläufe bei der Antikörper-abhängigen zellulären Zytotoxizität vermittelt durch IgA- und IgG-Antikörper. IgA- bzw. IgG-Antikörper binden im 1:2 Verhältnis an CD89 bzw. im 1:1 Verhältnis an FcγRI-III-Rezeptoren und aktivieren über ITAM-Signalwege Granulozyten, Monozyten und NK-Zellen. Diese reagieren mit Degranulierung. Granulozyten und Monozyten bewirken die Lyse der Zielzelle durch die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies und Freisetzung von proteolytischen und zytolytischen Enzymen. Die Perforine der NK-Zellen bilden einen membrandurchdringenden Komplex, wodurch Granzyme das Zellinnere angreifen können und die Zellyse induzieren.

Bei der ADCC opsonisieren die Antikörper eine Zielzelle durch die Bindung eines spezifischen Antigens und rekrutieren über den Fc-Rezeptor Effektorzellen. Dadurch bildet sich zwischen Zielzelle und Effektorzelle eine immunologische Synapse. Granulozyten und Monozyten reagieren auf die Aktivierung durch Antikörper mit der Ausschüttung ihrer Granula und der Bildung von radikalen reaktiven Sauerstoffspezies (Babior 2004). Durch die Produktion von Radikalen wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Superoxidanion (O_2^-) oder Hydroxidanion (OH^-) sowie die

Freisetzung von zytolytischen Enzymen wie Serinproteasen (Elastase), Lactoferrin und Gelatinasen (Borregaard 1997) wird ein umfangreiches Arsenal an zytolytischen Substanzen freigesetzt, welches über die immunologische Synapse die Zielzelle zerstören. NK-Zellen vermitteln die Lyse der Zielzellen durch Freisetzung von Perforinen und Granzymen (Cullen 2008). Perforine sind Zytolysine, die in die Membran der Zielzelle inserieren und ähnlich zum Membranangriffskomplex der Komplementkaskaden polymerisieren und so ein Loch in der Membran erzeugen. Durch dieses Loch wird zum einen die Zielzelle lysiert, zum anderen können Granzyme in die Zelle eindringen und z.B. im Falle des Granzym B die DNA fragmentieren.

In vitro konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass IgA-Antikörper über FcαRI die Phagozytose von Pathogenen und ADCC von Tumorzellen induzieren können (Weisbart 1988, Monteiro 1990, Deo 1998). Weitere Arbeiten zeigten, dass humane IgA1- und IgA2-Antikörper gegen den EGFR *in vitro* effizienter sind als der klinisch zugelassene Cetuximab (225-IgG1, Dechant 2007, Beyer 2009).

1.3.7.2. Komplement-basierte Wirkmechanismen

Es existieren mehrere Veröffentlichungen über die Beteiligung des Komplementsystems an der Effektivität von Antikörpern (Brüggemann 1987, Maloney 2002, Taylor 2006, Introna 2009). Grundsätzlich können Antikörper über drei Wege das Komplementsystem aktivieren: Den klassischen Weg über C1q, den Mannan-bindenden-Lektin-(MBL)-Weg durch die Deposition des MBL und durch den alternativen Weg mittels Hydrolyse von C3. Im Allgemeinen wird das Komplementsystem mit IgG- und IgM-Antikörpern durch die Bindung des Komplementfaktors C1q an den Fc-Teil der Antikörper induziert. Die damit verbundene Initiation der klassischen Komplementkaskade endet in der Formation eines Membranangriffskomplexes (MAC), wodurch die Zielzelle schließlich lysiert wird (Abb. 9, Burritt 1977, Jarvis und Griffiss 1989).

Für die in der Therapie von Lymphomen bzw. Leukämien eingesetzten IgG1-Antikörper Rituximab (CD20-gerichtet, Di Gaetano 2003) bzw. Campath (CD52-gerichtet, Wendtner 2004) konnte die Aktivierung des Komplementsystems zur Bekämpfung des Tumors nachgewiesen werden. Die Komplementaktivierung stellt für IgA-Antikörper ein kontrovers diskutierter Punkt dar. Allerdings konnte für EGFR-gerichtete IgA-Antikörper bereits gezeigt werden, dass sie keine Komplement

abhängige Zytotoxizität (CDC, Complement dependent cytotoxicity) vermitteln (Dechant 2008, Lohse 2010).

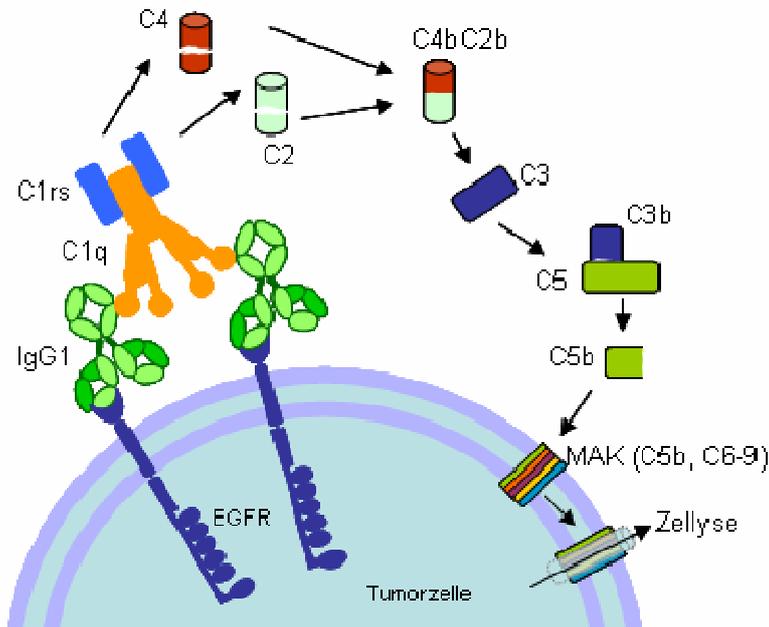


Abbildung 9: Vereinfachte Darstellung der Aktivierung der klassischen Komplementkaskade durch Immunglobuline des IgG1-Isotyps. Die Oponisierung der Tumorzelle durch IgG1-Antikörper führt zur Deposition der Komplementkomponenten C1q, C1r und C1s. Die klassische Kaskade beginnt mit der proteolytischen Spaltung von C2 und C4. Deren Spaltprodukte C2b und C4b bilden zusammen ein Enzym, welches C3 in C3a und b umsetzt. Die b-Komponenten bilden nun die C3-Konvertase, die C5 spaltet. C5b initiiert nun die Bildung des Membranangriffskomplexes, was zur Lyse der Zielzelle führt. (angelehnt an Janeway 2004)

1.3.8. Pharmakokinetik

Neben den Fc-Rezeptoren auf den Effektorzellen, welche wichtig für die Funktion der Antikörper sind, existieren weitere Rezeptoren, die ebenfalls einen Einfluss auf die Funktionalität und die Pharmakokinetik haben (Wines und Hogarth 2006, Monteiro und van der Winkel 2003).

Die Pharmakokinetik von IgG- und IgA-Antikörpern wird durch ihre Affinität zu bestimmten Rezeptoren beeinflusst. IgG-Antikörper binden an den neonatalen Fc-Rezeptor FcRn (Ghetie 2000). Dadurch werden IgG-Antikörper internalisiert und damit vor der proteolytischen Spaltung durch Serumproteasen und der Rückgewinnung durch die Leber bewahrt (Ghetie 2002). Dieser Mechanismus verlängert die Serumhalbwertszeit von IgG-Antikörper auf 21 Tage. Für IgA-Antikörper existiert kein äquivalenter Fc-Rezeptor. Darüber hinaus interagieren IgA-Antikörper mit dem Asialoglykoproteinrezeptor (ASGPR). Dieser wird auf

Hepatozyten exprimiert (Tomana 1987, Stockert 1982) und erkennt terminale Galaktose, worauf diese internalisiert und degradiert werden. Der ASGPR spielt eine große Rolle bei der Rückgewinnung von IgA aus dem Blutkreislauf (Stockert 1995) und ist damit von entscheidender Bedeutung für die Pharmakokinetik von IgA-Antikörpern. Aufgrund der O-Glykosylierungen in der Gelenkregion ist die Bindung des IgA1 an den ASGPR weniger affin, eine mögliche Ursache für den höheren Serumspiegel an IgA1 (Rifai 2000, Sakamoto 2001). Durch die Interaktion und die Rückgewinnung aus dem Blut mittels des ASGPR in der Leber verkürzt sich die Halbwertszeit der IgA-Antikörper auf 6 Tage.

Daneben gibt es weitere Rezeptoren, mit denen IgA-Antikörper interagieren können. Zu diesen zählen der Transferrin-Rezeptor (TfR, CD71, Monteiro 2002, Moura 2001), Galectin 1 und eine Reihe weiterer erst kürzlich entdeckter Rezeptoren wie der Fcα/μR und der Fcα1/δR, deren Funktionen bisher unbekannt sind (Wines and Hogarth 2006).

Insgesamt lassen sich viele Interaktionen der IgA-Antikörper mit den verschiedenen Rezeptoren auf bestimmte Glykosylierungsmuster der IgA-Antikörper zumeist des IgA1-Isotyps zurückführen, oder nur unter bestimmten Bedingungen nachweisen.

1.3.9. Physiologische Bedeutung der Antikörper

1.3.9.1. Physiologische Bedeutung von IgG

Im Verlauf einer Infektion erfolgt ein Isotypklassenwechsel von IgM zu IgG. Die Plasmazellen produzieren in einer verzögerten Abwehrphase IgG-Antikörper, die spezifisch und hochaffin für das Antigen sind. Auch aufgrund der hohen Serumhalbwertszeit ist IgG der häufigste Antikörperisotyp. Mit der strikt monomeren Form durchschreiten sie das Endothel der Blutgefäße und gelangen ins Interstitium. IgG-Antikörper überschreiten auch die Plazentaschranke und übertragen die maternale Immunität passiv auf den Fötus. Die Hauptfunktion von IgG besteht in der Abwehr von zirkulierenden Erregern und Toxinen und in der Aktivierung des Komplementsystems (Janeway 2004).

1.3.9.2. Physiologische Bedeutung von IgA

Es existieren verschiedene Modelle für die physiologische Bedeutung von dimerem und sekretorischem IgA (Abb. 10, Phalipon 2003). Unter physiologischen Bedingungen wird dimeres IgA von Plasmazellen in der Lamina Propria produziert

und von den Epithelzellen über den pIgR-basierten Prozess der Transzytose auf die luminal Seite der Epithelien transportiert und dort als SIgA freigesetzt (Modell 1, Burns 1996, Renegar 1991, Phalipon 1995). Die SC kann auch unabhängig von dimerem IgA sezerniert werden (Modelle 1', Phalipon 2003).

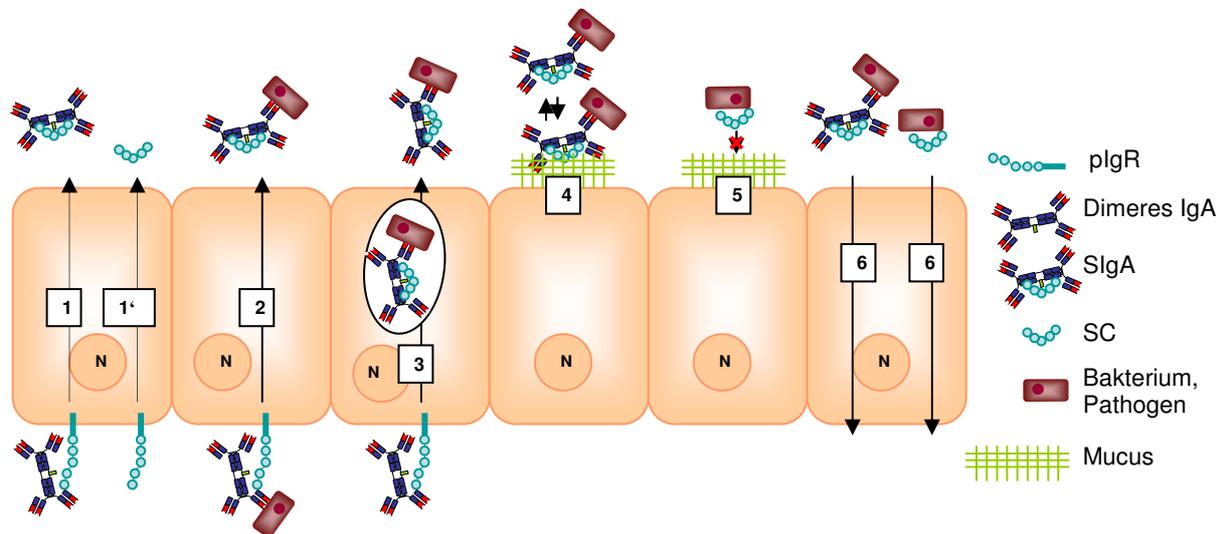


Abbildung 10: Zusammenfassung der Funktionen von dimerem, sekretorischem IgA und der sekretorischen Komponente. Die Darstellung zeigt, wie die epitheliale Immunabwehr funktioniert und wie dimeres IgA und der pIgR über verschiedene Wege dazu beitragen. Dimeres IgA bindet an die extrazelluläre SC des pIgR und wird via Transzytose auf die luminal Seite der Epithelzelle transportiert (1). Der pIgR wird auch ohne Ligand endozytotisch aufgenommen und die SC auf der luminalen Seite der Zelle abgespalten, wodurch freie SC entsteht (1'). Pathogene können in der Mukosa von dimerem IgA gebunden werden. Durch den pIgR-basierten Transport gelangen diese Pathogene in das Lumen, was deren Immunexklusion zur Folge hat (2). Ein weiteres Modell für die Funktion von dimerem IgA ist die intrazelluläre Neutralisierung von Antigenen (3). Die Hauptfunktion von dimerem IgA (4) und freier SC (5) besteht in der Neutralisierung von kommensalen und pathogenen Bakterien. Sie verhindern dabei die Kolonisierung der Schleimhaut. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass von dimerem IgA und der SC gebundene Antigene aus dem Lumen in die Mukosa transportiert werden (6). In darmassoziierten lymphoidalen Geweben wird dann eine humorale IgA-basierte Immunantwort gegen diese Antigene induziert (Phalipon 2003, modifiziert).

Darüber hinaus kann dimeres IgA Pathogene auf der basolateralen Seite der Mukosa neutralisieren und mit diesen verbunden auf die luminal Seite transportiert werden, was letzten Endes zur Immunexklusion des Pathogens führt (Modell 2, Renegar 2001, Phalipon 2003). Bei dem Prozess der Transzytose von dimerem IgA ist es durchaus möglich, dass Pathogene – im Besonderen Viren aber auch Lipopolysaccharid – intrazellulär abgefangen und ausgeschleust werden (Modell 3, Fernandez 2003, Boullier 2009). Eine der Hauptfunktionen des SIgA und der freien SC ist die

Neutralisierung von Pathogenen auf der mukosalen Oberfläche (Modelle 4 und 5, Brandtzaeg 2009), so dass diese nicht in Kontakt mit dem Epithel kommen. Hier gibt es mehrere Möglichkeiten: Das dimere IgA kann sowohl aufgrund seiner Antigenspezifität gezielt das Pathogen binden, als auch über die Glykane der SC Pathogene neutralisieren (Royle 2003). Ein weiteres Modell besteht in dem Transport von SIgA und SC aus dem Lumen in die Lamina Propria (Modell 6, Brandtzaeg 2009). Sekretorisches IgA ist ein Beispiel dafür, wie angeborene (SC) und erworbene Immunität (dIgA) erfolgreich zusammen arbeiten können, um den Organismus vor Bakterien, Viren und anderen Fremdkörpern zu schützen.

Dimeres und sekretorisches IgA sind wesentlich daran beteiligt, die Homöostase der Schleimhaut aufrechtzuerhalten. Kontinuierlich werden deren Komplexe mit Bakterien, kommensal oder pathogen, durch Mikrovilli-(M)-Zellen aufgenommen (Brandtzaeg 1987). Auf der Innenseite des darmassoziierten lymphoidalen Gewebes werden diese Komplexe von dendritischen Zellen aufgenommen, welche dann zu den lymphoidalen Follikeln wandern und die Antigene Lymphozyten präsentieren. Gleichzeitig produzieren sie Interleukin-10, welches in den B-Zellen durch die sogenannte Klassen-Wechsel-Rekombination den Isotypwechsel zu IgA veranlasst (Faragasan 2004, Brandtzaeg and Johansen 2005), ein Vorgang der durch Cytokine verstärkt werden kann (Coffman 1989, Kunitomo 1988). Die Reifung der IgA-produzierenden Plasmazellen kann abhängig und unabhängig von CD4-positiven T_{Helfer}2-Zellen induziert werden (Franco 1997). Durch chemotaktische Anlockung mittels Chemokinen werden die B-Zellen zu den mukosalen Geweben gelockt (Bowman 2002, Kunkel 2003). Dabei besteht zwar eine Präferenz für die mukosalen Gewebe, an denen sie induziert wurden, aber sie gelangen auch zu anderen epithelialen Geweben (Husband 1978), z.B. den Brustdrüsen. Damit werden auch in diesem Epithel IgA-Antikörper gegen kommensale und pathogene Bakterien und Erreger gebildet und über die Muttermilch an das Neugeborene weitergeben. Dadurch erhält das Neugeborene zum einen Schutz gegenüber Erregern (Lucas 1991) und zum anderen wird dadurch die Zusammensetzung der Darmflora des Kindes beeinflusst (Kramer 1995). Nach der Induktion von IgA-produzierenden Plasmazellen, produzieren diese dimeres IgA, welches durch die Transzytose als SIgA in das Lumen transportiert wird und dort Pathogene daran hindert, die Schleimhaut zu kolonisieren oder zu durchdringen. Damit besteht die Hauptfunktion von SIgA, neben der Neutralisierung von Pathogenen in der limitierenden Kontrolle

der kommensalen Bakterien (Macpherson 2004). Dies begründet auch, dass SIgA das meistproduzierte Antikörperformat darstellt (3 g SIgA pro Tag, Faragasan 2004, Woof und Mestecky 2005, Brandtzaeg 2009). Es wird spekuliert, dass monomeres IgA, welches die dominierende IgA-Spezies im Serum darstellt, Pathogene und kommensale Bakterien neutralisiert, welche die Epithelien durchdrungen haben (Otten 2004, Snoeck 2006, Faragasan 2004, Corthesy 2007). Der IgA-Fc-Rezeptor, Fc α RI, wird auf einer Spezies der dendritischen Zellen, den Kupffer Zellen, exprimiert. Diese leberständigen Zellen sind in der Lage Immunkomplexe aus monomerem Serum-IgA und Bakterien phagozytotisch aufzunehmen (van Egmond 2000). Die physiologische Bedeutung der Antikörper, insbesondere der IgA-Antikörper, besteht somit hauptsächlich in der Neutralisierung und Immunexklusion von kommensalen und pathogenen Bakterien und Viren.

1.4. Problemstellung

1.4.1. Voraussetzungen

Aufgrund der Beteiligung an der Pathogenese von epithelialen Karzinomen, eignet sich der EGFR als Zielstruktur für eine zielgerichtete Tumorthherapie. Die eingesetzten monoklonalen Antikörper sind therapeutisch wirksam und nebenwirkungsärmer als konventionelle Chemotherapeutika aber dennoch nicht kurativ (Peipp 2009). Somit besteht weiterhin der Bedarf die Therapie zu optimieren. Eine Möglichkeit könnte der Wechsel vom IgG- zum IgA-Isotyp darstellen. IgA-Antikörper haben gegenüber dem IgG-Isotyp folgende Vorteile: Zunächst können IgA-Antikörper Granulozyten und Monozyten/Makrophagen über ihren Fc-Rezeptor rekrutieren und damit Effektorzellpopulationen, die im Falle von soliden Tumoren von Bedeutung sind (Keler 2000, Clark 2010) und darüber hinaus die größere Anzahl an Effektorzellen darstellen. Die effektive Interaktion mit dem Fc-Rezeptor und der damit verbundenen stärkeren Aktivierung von zytolytischen Wirkmechanismen stellen weitere Vorteile dar (Woof 2004). Die stärkere Aktivierung von Granulozyten durch IgA-Antikörper konnte bereits in einer vorangegangenen Studie gezeigt werden (Dechant 2008). Allerdings fehlen in der Literatur funktionelle Daten bezüglich der direkten und indirekten Effektmechanismen von definierten Präparationen von monomerem IgA und insbesondere von dimerem IgA. Darüber hinaus diffundieren IgA-Antikörper in ihrer dimeren Form effizienter durch Basallaminae und sind in der Lage, Epithelien besser zu erreichen und zu durchdringen (Brandtzaeg 1981).

Möglicherweise stellt die fehlende Fähigkeit der IgA-Antikörper das Komplementsystem zu aktivieren (Lohse 2010), einen weiteren Vorteil dar. Trotz dieser möglichen Vorteile werden IgA-Antikörper bisher nicht in der Therapie eingesetzt. Gründe hierfür sind, dass bisher keine geeigneten Systeme für die Expression, Produktion und Aufreinigung von IgA-Antikörpern etabliert wurden, wie sie für IgG-Antikörper existieren. Für diese gibt es mit dem Glutamin-Synthetase (GS)-Expressionssystem in Säugetierzellen und der Aufreinigung über die Affinität zu Protein A bereits etablierte Verfahren für die Herstellung von therapeutischen IgG-Antikörpern (Chu und Robinson 2001, Wurm 2004, Browne und Al-Rubeai 2007). Für die Herstellung von IgA-Antikörpern, insbesondere von dimerem IgA, gibt es einzelne Berichte über die Expression in Säugetierzellen, die Produktion in verschiedenen Systemen (Johansen 1999, Favre 2003, Mantis 2007) und die Aufreinigung über verschiedene ineffiziente Methoden (Belew 1987, Leibl 1995, Gregory 1987, Nilson 1993, Morton 1993, Lindahl 1990, Stenberg 1994, Areschoug 2002). Aufgrund der beschriebenen Problematik ergaben sich für die vorliegende Arbeit folgende Arbeitsziele.

1.4.2. Ziele

1. Herstellung von monomerem und dimerem IgA

Mit dem im Vorfeld zu dieser Arbeit etablierten GS-Expressionssystem sollte die Expression von rekombinanten monomeren EGFR-IgA-Antikörpern optimiert und für dimeres IgA etabliert werden. Des Weiteren sollte ein Produktionssystem etabliert werden, mit dem es möglich wird, auf effiziente Art und Weise hohe Mengen an rekombinanten IgA-Antikörpern herzustellen. Da die bisher angewandten Strategien zur Aufreinigung von IgA-Antikörpern bezüglich der Reinheit, den Verlusten und der Anwendbarkeit ineffizient waren, sollte eine neue Strategie entwickelt werden, um hochreine Präparationen von monomerem und dimerem IgA zu gewinnen.

2. Biochemische Charakterisierung

Im Rahmen einer biochemischen Charakterisierung sollte geklärt werden, ob die hergestellten IgA-Konstrukte aus korrekt zusammengebauten leichten und schweren Ketten bestehen und im Falle des dimeren IgA, auch die J-Kette inkorporiert wurde. Darüber hinaus sollten die Antikörper mit kommerziellen Antikörpern verglichen

werden, um zu untersuchen, ob sie ähnliche oder unterschiedliche biochemische Eigenschaften besitzen.

3. Funktionelle Charakterisierung

Neben den technischen Schwerpunkten stellte die funktionelle Charakterisierung den thematischen Schwerpunkt dieser Arbeit dar. Kernpunkte waren der funktionelle Vergleich der einzelnen Isotypen IgG1, IgA1 und IgA2 und von dimerem IgA zu monomerem IgA. Insbesondere für das IgA-Dimer sollte geklärt werden, da in der Literatur hauptsächlich nur *in silico*-Vorhersagen zu finden sind. Die Fähigkeit an den pIgR zu binden und via Transzytose auf eine Epithelzellschicht transportiert zu werden, ist eine weitere Eigenschaft, die für das Dimer nachgewiesen werden sollte. Ein wichtiger Aspekt dieser Charakterisierung war die unterschiedliche Rekrutierung von verschiedenen Effektorzellen (Granulozyten, Monozyten, Vollblut) ein wichtiger Punkt, da z.B. für monomeres und dimeres IgA bisher nicht deren Fähigkeit nachgewiesen wurde, Monozyten für die Lyse von Tumorzellen aktivieren zu können. Die funktionelle Charakterisierung sollte das Ziel haben, das therapeutische Potential von monomerem und dimerem IgA zu erfassen, um diese als interessante Alternative zu den bisher therapeutisch eingesetzten EGFR-IgG-Antikörpern vorzustellen.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

Eine komplette Liste der verwendeten Materialien befindet sich im Anhang.

2.2. Methoden

2.2.1. Zellbiologische Methoden

2.2.1.1. Kultivierung von Zellen

Bei adhärennten Zellen erfolgte die Passage der Zellen, indem das Medium verworfen wurde, die Zellen mit einer Trypsin-EDTA-Lösung (0,25 %) gewaschen und anschließend mit dieser für mehrere Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubiert wurden. Die suspendierten Zellen wurden in ihrem entsprechenden Medium aufgenommen, und anschließend in Verhältnissen von 1:2 bis 1:20 je nach Bedarf in neuen Kulturflaschen (25, 75, 175 cm²) ausgesät. Diese wurden in einem Brutschrank bei 37°C und 5 v/v % CO₂ gelagert. Die Suspensionszellen wurden ohne Behandlung mit Trypsin in ähnlichen Verhältnissen in neuen Kulturflaschen mit frischem Medium versorgt. Da Raji- und BaF3-Zellen sehr stark proliferierten wurden sie 1:20 bis 1:50 verdünnt. Wurden die Zellen für Versuche verwendet wurde die Suspension in einem Verhältnis von 1:5 mit einer Trypanblaulösung verdünnt. Im Falle der in Bioreaktoren kultivierten CHO-Zellen mussten die Zellen mindestens 1:20 verdünnt werden. 10 µl dieser Verdünnung wurden in eine Neubauer-Zählkammer (VWR) überführt und die Zellzahl im Lichtmikroskop bestimmt. Die Berechnung der Zellzahl erfolgte nach der Formel: Zellzahl/ml = gezählte Zellzahl aus 4 Quadranten/4 x Verdünnungsfaktor x 10000.

Im Laufe des Projektes war es erforderlich, Aliquots der einzelnen Zellen einzufrieren. Hierfür wurden die suspendierten Zellen in 15 ml Falcons überführt, bei 1200 U/min für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in Einfriermedium, bestehend aus 16 % DMSO in FCS, resuspendiert, in ein Kryogefäß überführt und bei -80°C eingefroren. Für die Langzeitaufbewahrung wurden die Kryogefäße in einen Tank mit flüssigem Stickstoff gelagert. Im Allgemeinen wurden die Zellen nach 20-30 Passagen verworfen und ein neues Aliquot aufgetaut. Hierfür wurde das eingefrorene Kryogefäß bis zum vollständigen Solubilisieren des Inhalts bei 37°C im Wasserbad erwärmt. Danach wurde der Inhalt mit 9 ml des entsprechenden Kulturmediums verdünnt und die Zellen für 5 min bei 1200 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 9 ml ihres

Charakterisierung rekombinanter IgA-Antikörper gegen den EGFR
- Materialien und Methoden -

Kulturmediums resuspendiert und in einer 25 cm² Kulturflasche ausgesät. Die mögliche Kontaminierung mit Mycoplasmen wurde regelmäßig unter Verwendung des Mycoalert Mycoplasma Detektionskit gemäß dem Herstellerprotokoll überprüft. Im Rahmen der funktionellen Untersuchungen sowie der Herstellung der Antikörper wurden folgende Zellen verwendet.

Zelllinie	Ursprung	Medium	Bestandteile	Herkunft
A431 (adhärent)	Humanes epidermoidales Karzinom	RPMI 1640	10 % fötales Kälberserum (FCS), 1 % Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	DSMZ*
DiFi (adhärent)	Humanes Kolonkarzinom	Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	10 % FCS 1 % Pen/Strep	ECACC**
BaF3 (adhärent)	Murines B-Lymphom	RPMI 1640	10 % FCS 1 % Pen/Strep Hygromycin 1 mg/ml 10 % WEHI Überstand (enthält Interleukin-3)	(Peipp 2008)
A1207 (adhärent)	Glioblastom	DMEM	10 % FCS 1 % Pen/Strep	DSMZ
Raji (Suspension)	Humanes B-Lymphom	RPMI 1640	10 % FCS 1 % Pen/Strep	DSMZ
BHK-21 CD89+/ CD16a+ (adhärent)	Immortalisierte Baby-Hamster-Nieren-Zellen	RPMI 1640	10 % FCS 1 % Pen/Strep 1 mg/ml Geneticin 50 µg/ml Methotrexat	Dechant 2002/Peipp 2009
Madin-Darby-Canine-Kidney (MDCK) (adhärent)	Nierenepithelzellen vom Cocker Spaniel	Minimal Essential Medium (MEM)	10 % FCS 1 % Pen/Strep 1 % L-Glutamine (100mM)	ECACC
MDCK plgR+ (adhärent)	MDCK transfiziert mit humanem plgR	MEM	10 % FCS 1 % Pen/Strep 1 % L-Glutamine (100mM) 1 mg/ml Hygromycin	Eigene Transfektion
Adhärente CHO-K1	Chinesische Hamster Ovarien, IgA transfizierte CHO-K1	DMEM-Select	10 % FCS 1 % Pen/Strep 6 µg/ml L-Glutamat 6 µg/ml L-Asparagin 7 µg/ml Guanosin/Cytidin/Uridin/Thymidin	CHO von Lonza
CHO-K1 in Suspension	Chinesische Hamster Ovarien, IgA transfizierte CHO-K1	CD-CHO-Select (Chemisch definiertes CHO-Medium)	1 % HT-Supplement (10 mM Natriumhypoxanthin, 1,6 mM Thymidin) 0,5 % Pen/Strep 50 nM MSX 40 ng/ml Phenolrot	-
CHO-K1 in Suspension	IgA und J-Kette transfizierte CHO-K1	CD-CHO-Select	CD-CHO-Select 1 mg/ml Puromycin	-

*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen **Health Protection Agency Culture Collections

2.2.1.2. Isolierung von Immunzellen aus peripherem Blut

Für die Isolierung von Immunzellen aus peripherem Blut wurde eine Percoll-Dichtegradientenzentrifugation angewandt. In einem 15 ml Falcon wurden 3 ml 70%iges Percoll (35 ml Percoll und 15 ml PBS) vorgelegt. Dieses wurde im Anschluss mit 3 ml 63%igem Percoll (31,5 ml Percoll und 18,5 ml Hanks) überschichtet. Auf diese Phase wurden 10 ml Citratblut gegeben. Der präparierte Gradient wurde 20 min bei 2500 U/min und der Bremseinstellung 1 zentrifugiert. Nach der Zentrifugation bestand der fertige Gradient aus 4-5 Schichten (Abb. 11):

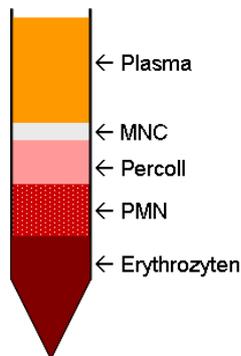


Abbildung 11: Graphische Darstellung des Gradienten, der aus 5 Schichten aufgebaut ist.

Zur weiteren Aufreinigung monomorphonukleärer Zellen (MNC), hauptsächlich bestehend aus Monozyten und Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), wurde mittels einer serologischen Pipette die zweite Fraktion von oben abgenommen und in einem 50 ml Falcon gesammelt. Die Percoll-Schicht wurde durchstoßen, um die darunter liegende Schicht aus polymorphonukleären Zellen (PMN) und Erythrozyten, in der sich auch PMN befinden, abzunehmen. Die MNC-Fraktion wurde mit 1xPBS auf ein Gesamtvolumen von 50 ml aufgefüllt. Die PMN wurden à 5 ml auf 50er Falcons verteilt und diese dann mit 45 ml 1xPBS aufgefüllt. Beide Fraktionen wurden danach für 5 min 1800 U/min mit Bremseinstellung 1 zentrifugiert. Im Falle der MNC wurde der Überstand verworfen, das Pellet aufgeklopft und erneut in 50 ml 1xPBS resuspendiert. Im Falle der PMN wurde die obere Schicht vorsichtig abgekippt. Danach erfolgte die Lyse der Erythrozyten: Diese wurden mit kaltem destilliertem Wasser auf 45 ml aufgefüllt, dreimal invertiert und für 30 sek inkubiert. Danach wurden 5 ml 10xPBS zugegeben und die Lösung einmal invertiert. Die MNC- und PMN-Falcons wurden danach für 5 min bei 1600 U/min mit Bremsleistung 2 zentrifugiert. Bei der MNC-Fraktion wurde wieder der Überstand verworfen, die Zellen im Medium der Zielzellen aufgenommen und via Trypanblaufärbung gezählt.

Bei den PMN erfolgte eine weitere Erythrozyten-Lyse mit anschließender Zentrifugation. Erst danach wurden auch die PMN im Medium der jeweiligen Tumorzelllinie aufgenommen und gezählt.

Für die gezielte Isolation von Monozyten wurde eine andere Aufreinigungsstrategie verfolgt. Hierbei wurde zunächst die MNC-Fraktion mittels einer Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation präpariert. Dazu wurden 15 ml Ficoll-Lösung mit 20 ml 1:8 verdünntem Blut überschichtet. Danach erfolgte eine Zentrifugation für 20 min bei 2000 U/min. Anschließend wurde die MNC-Schicht mit einer sterilen serologischen Pipette entnommen. Die nun präparierten MNC wurden mindestens viermal in 40 ml 1xPBS gewaschen. Danach wurden die Zellen in 10 ml 1xPBS aufgenommen und gezählt. Von dieser Zellsuspension wurden 4×10^8 Zellen entnommen, abzentrifugiert und danach in 800 μ l 1xPBS pro 1×10^8 Zellen aufgenommen. Anschließend wurden 200 μ l einer Lösung von magnetischen Kügelchen, welche gegen CD14, einen Oberflächenmarker von Monozyten, gerichtet waren, pro 1×10^8 Zellen hinzugegeben. Die Suspension aus MNC und magnetischen Kügelchen wurde nun für 20 min bei 4°C inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden die Zellen insgesamt in 12 ml 1xPBS aufgenommen und jeweils 3 ml dieser Suspension über ein Zellsieb, dadurch wurden Aggregate und grobe Verunreinigungen aufgefangen, auf MACS LS Zellseparationssäulen gegeben. Diese Säulen waren eingespannt in Magnete, und wurden zuvor mit 3 ml 1xPBS äquilibriert. Nachdem die Zellsuspension die Säule passiert hatte, wurde die Säule dreimal mit 3 ml 1xPBS gewaschen. Danach wurde die Säule vom Magneten genommen, weitere 3 ml 1xPBS aufgefüllt, und diese mittels des Stempels durchgedrückt. Die somit eluierten Monozyten wurden nach einmaligem Waschen mit 1xPBS auf eine Zelldichte von 8×10^6 eingestellt. Die Reinheit der isolierten Fraktionen wurde im Anschluss im Durchflusszytometers (siehe 2.2.1.7.) im Vorwärts- und Seitwärtsfilter analysiert und auf $\geq 95\%$ bestimmt.

2.2.1.3. Adaption von CHO-Zellen an serumfreie Suspensionsbedingungen

In einem Zwei-Stufen-Plan wurden die IgA und J-Kette produzierenden Einzelklone (siehe 2.2.2.1.) an serumfreie Suspensionskulturbedingungen adaptiert (Beyer 2009). In der ersten Stufe wurden die CHO-Zellen auf einem Orbitalschüttler bei 150 U/min kultiviert. Alle 4 Tage wurden die Zellen trypsinisiert bis alle Zellen schließlich ihre Adhärenz verloren hatten und sich ein normales Zellwachstum unter

Suspensionsbedingungen eingestellt hatte. In Stufe 2 folgte die Adaptionsphase an das serumfreie CD-CHO-Select-Medium. Dabei wurde schrittweise das DMEM-Selektionsmedium gegen das CD-CHO-Select-Medium ausgetauscht, beginnend bei Verhältnissen von 99:1 bis 1:99 (DMEM-Select:CD-CHO-Select) bis die Zellen schließlich in 100 % CD-CHO-Select wuchsen. Gleichzeitig wurde ein Teil der Zellen direkt in 100 % CD-CHO-Select überführt, da es möglich war, dass diese spontan in Suspension übergangen.

2.2.1.4. Herstellung der Expressionsvektoren

Die fertigen Expressionsvektoren für alle IgA-Konstrukte sowie der J-Kette standen zu Beginn dieser Arbeit bereits zur Verfügung. Die Generierung der Vektoren erfolgte nach dem in Boel's Studie dargestellten Verfahren (Boel 2000). Die mRNA der variablen Teile der leichten und schweren Ketten wurden aus dem HB-8508-Hybridom gewonnen (ATCC, Manassas, VA), welches den 225-Antikörper gegen den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor exprimiert. Im Anschluss an eine cDNA-Synthese wurden spezifische Primer für ein Set von V-Genen (Vidarsson 2001) und die *Pwo*-Polymerase (Peqlab) benutzt, um die variablen Regionen mittels PCR zu vervielfältigen. Die HAVT20-Leader-Sequenz ist wichtig für die Sekretion der Antikörper, daher wurden die variablen Regionen zunächst in den pUC-HAVT20-Vektor kloniert. Die durch Sequenzierung (Applied Biosystems) überprüften Sequenzen wurde nun in den pNUT-Vektor subkloniert, welcher die Gene für die leichten und schweren Ketten des IgA1- beziehungsweise des IgA2-Isotyps kodiert (Genbank Accession Nummer AY647978 und AY647979). Mit dem Ziel die Produktion technisch zu vereinfachen und zu optimieren wurde im Folgenden ein Expressionssystem von Lonza, bestehend aus dem pEE14.4 Glutamin-Synthetase (GS)-Vektor, verwendet. Über *Sma*I- und *Eco*RI-Restriktionsschnittstellen wurden die Expressionskassetten für die finale Klonierung in den pEE14.4 GS-Vektor eingefügt. Die Transkriptionskassette beinhaltet nun den Promotor des humanen Cytomegalovirus (hCMV-MIE, ursprünglich aus dem hCMV aus dem Stamm AD169) und die 5' untranslatierten Bereiche und das erste Intron des hCMV-MIE-Gens, die zusammen die Transkriptionsrate erhöhen und den Transport der mRNA ins Cytosol verstärken. Um mögliche Interferenzen zwischen den Promotoren zu minimieren steht das Gen der GS, welches als Selektionsmarker im GS-System von Lonza fungiert, unter dem Einfluss des schwachen Simian Virus (SV) 40 Promotors.

Letztendlich konnten dadurch Konstrukte (siehe Abb. 12 A, B, C) erhalten werden, welche optimale Voraussetzungen für die Expression der Immunglobuline besitzen.

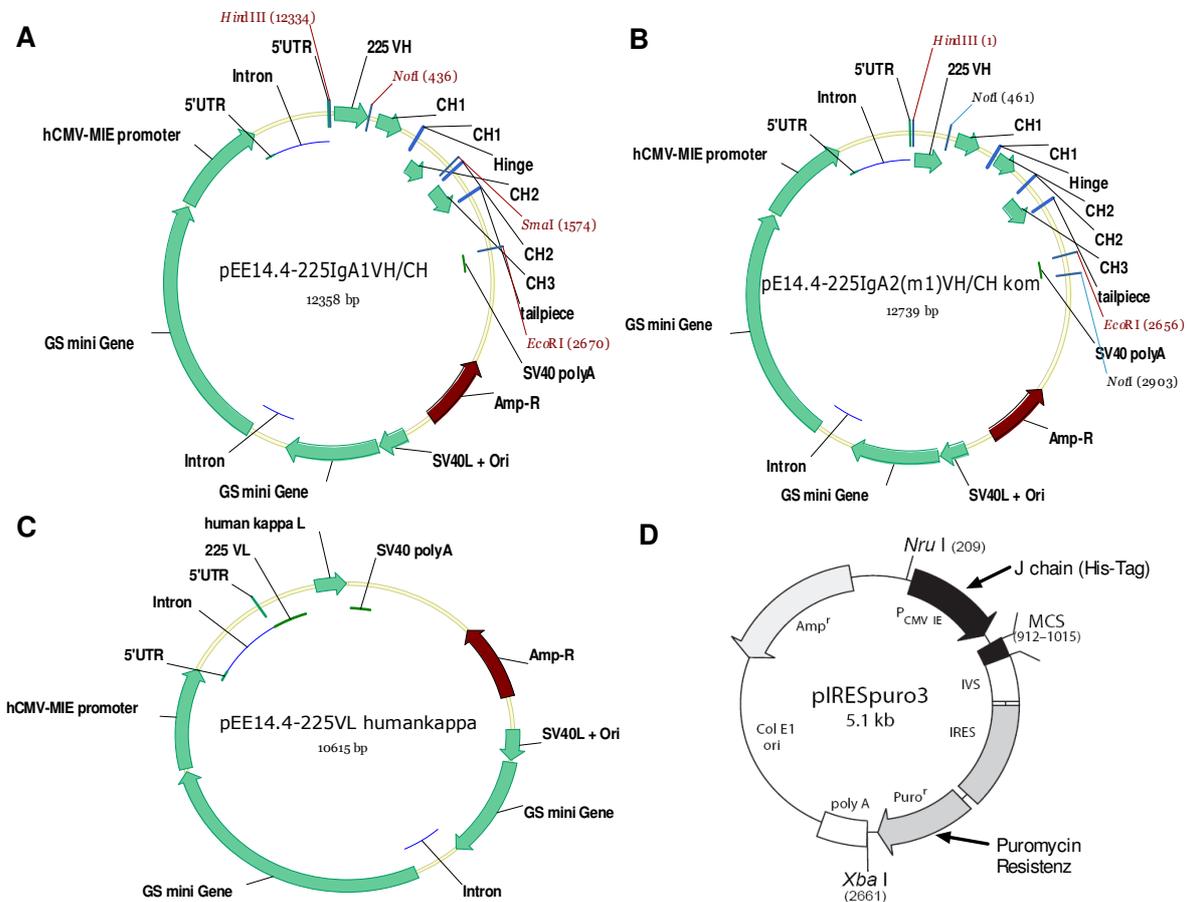


Abbildung 12: Vektorkarten der eingesetzten Expressionsvektoren. Die Gene für die leichten und die schweren Ketten für IgA1 (A) und IgA2 (B) wurden in den pEE14.4 Vektor von Lonza kloniert. (C). Damit steht die Expression dieser Gene unter der Kontrolle des GS-Expressionssystems. Die J-Kette (D) wurde in den pIRESpuro3-Vektor kloniert. Durch die IRES-Sequenz wurde sichergestellt, dass Puromycin resistente Zellen auch die J-Kette exprimieren.

Die Klonierung der J-Kette erfolgte auf der Basis eines Vektors, welcher für die J-Kette in einem pcDNA3-Expressionssystem unter Hygromycin-Resistenz kodiert und freundlicherweise von Dr. Corthesy zur Verfügung gestellt wurde (Berdoz 1999). Aufgrund der Tatsache, dass es keinen monoklonalen Antikörper gegen die J-Kette gibt und für IgA-Antikörper eine spontane Dimerisierung nicht ausgeschlossen werden kann, wurde die J-Kette mittels *EcoRI*-Restriktionsschnittstellen in den pIRESpuro3/myc-his-Vektor (Clontech) kloniert (Abb. 12 D). Durch die Fusion der Penta-Histidin-Markierung wurde sowohl der Nachweis der Inkorporation der J-Kette

als auch die spezifische Aufreinigung von dimerem IgA mit inkorporierter J-Kette ermöglicht. Auch in diesem Vektor steht die Transkriptionskassette unter dem Einfluss des hCMV-MIE-Promotors. Durch die IRES-Sequenz werden J-Kette und das Puromycin-Resistenzgen zwingend nacheinander abgelesen, um zu garantieren, dass Puromycin-resistente Zellen zwangsläufig auch die J-Kette exprimieren. In Abbildung 12 sind die Konstrukte, die für die Herstellung von monomerem und dimerem IgA verwendet wurden, dargestellt.

Neben den Antikörper-exprimierenden Vektoren wurde in dieser Arbeit ein pcDNA3.1/HygroB-Vektor verwendet, in den die cDNA des humanen polymeren Immunglobulin Rezeptors (hplgR) kloniert war. Dieser Vektor wurde von Frau Charlotte Kaetzel zur Verfügung gestellt. Die cDNA des plgR befand sich in diesem Vektor stromabwärts des hCMV-Promotors, wohingegen das Gen für den Selektionsmarker Hygromycin vom SV40-Promotor kontrolliert wird. Die folgende Abbildung 13 zeigt eine Vektorkarte mit dem schematischen Aufbau des pcDNA3.1/HygroB/hplgR-Vektors (im Folgenden pcDNA3plgR genannt).

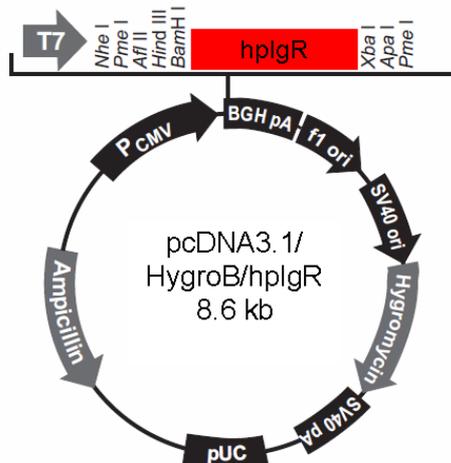


Abbildung 13: Vektorkarte des pcDNA3.1/HygroB/hplgR-Expressionsvektors. Die cDNA für den humanen polymeren Immunglobulin-Rezeptor (hplgR) wurde in diesen pcDNA3.1/HygroB-Vektor von Invitrogen kloniert. Die Transkription des Rezeptors wird gesteuert vom CMV-Promotor. Transfektanten wurden über die Hygromycin-Resistenz selektioniert.

2.2.1.5. Transfektion

Für die Transfektion der CHO-Zellen mit dem J-Kette-exprimierenden Vektor (siehe Abb. 12 D, 2.2.1.4.) wurden an serumfreie Suspensionskulturbedingungen adaptierte CHO-Zellen verwendet, die 24 h vor der Transfektion in Adhärenz gebracht wurden. Dafür wurden am Vortag der Transfektion die in serumfreiem Medium und Suspension wachsenden CHO-Zellen in DMEM-Select in 6-Well-Platten à $3,5 \times 10^5$

pro Well ausgesät. 10 µg des pRESpuro3J-Kette-Vektors wurden mittels der Restriktionsendonuklease *Pvu*-I für 2 h im 37°C warmen Wasserbad linearisiert und danach mittels des PCR-Purification-Kit gemäß dem Herstellerprotokoll aufgereinigt. Am Tag der Transfektion wurden pro Well 250 µl Opti-MEM vorgelegt und 10 µl Lipofectamine 2000 dazugeben und vorsichtig geschüttelt. 4 µg DNA des linearisierten pRESpuro3J-Kette-Vektors wurden in 250 µl Opti-MEM gelöst und anschließend 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. DNA- und Lipofectamine-Lösungen wurden zusammengeführt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein dreimaliges Waschen der adhärenen CHO-Zellen mit DMEM-Select ohne Pen/Strep, anschließend wurden pro Well 1,5 ml Opti-MEM zugegeben. Nach 4 h Inkubation im Brutschrank wurden 3 ml DMEM-Select mit Pen/Strep zugegeben. Nach weiteren 24 h erfolgte der Austausch des Mediums gegen CD-CHO-Select mit Puromycin (0,02 mg/ml). Nach 2 Tagen wurden die Zellen gegebenenfalls abtrypsinisiert und in einer Verdünnung von 3 Zellen/ml in 96-Well-Platten ausgesät und für mindestens 2-3 Wochen kultiviert. Die Identifikation von J-Kette produzierenden Einzelklonen erfolgt über den Nachweis von dimerem IgA im Überstand mittels Sandwich-ELISA (siehe 2.2.2.1.), und die Inkorporation der J-Kette in dieses dimere IgA via der fusionierten Penta-Histidin-Markierung (siehe 2.2.1.7.). Gut produzierende Einzelklone wurden danach erneut mit limitierender Verdünnung ausplattiert, um wiederum Einzelklone zu generieren. Mit dieser Methode war es möglich einen einzelnen Klon zu selektionieren, der hohe Konzentrationen des Antikörpers produzierte.

Für die Transfektion der MDCK-Zellen mit dem plgR-exprimierenden Vektor (siehe 2.2.1.4., Abb. 13) wurde als Transfektionsreagenz ebenfalls Lipofectamine 2000 verwendet. Die MDCK-Zellen wurden abtrypsinisiert und 5×10^5 Zellen pro 10-mm-Petrischale ausgesät. Diese wuchsen innerhalb von 24 h zu 50 % konfluent. Hier wurden 250 µl Opti-MEM mit jeweils 40 µl Lipofectamine und 20 µg cDNA des pcDNA3plgR für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden Lipofectamine- und cDNA-Lösung als Transfektionslösung zusammengeführt und weitere 30 min inkubiert. In der Zwischenzeit wurden MDCK-Zellen in den Petrischalen dreimal mit MDCK-Medium ohne Pen/Strep und Serum gewaschen und danach mit Opti-MEM überschichtet. Die Transfektionslösung wurde tröpfchenweise auf die Zellen gegeben. Nach 6 h wurde vollständiges MDCK-Medium und nach 48 h Hygromycin (1 mg/ml) zugegeben. Die Selektion erfolgte über 10 d, wobei täglich das

Medium erneuert wurde. Die selektionierten Transfektanten wurden in limitierender Verdünnung in 96-Well-Platten ausgesät, um Einzelklone zu generieren. Nachdem ein Einzelklon generiert worden war, erfolgte eine weitere Transfektion analog des beschriebenen Protokolls, um eine höhere Expression des humanen pIgR zu garantieren

2.2.1.6. Cytospin-Färbungen

Zum Nachweis des Erfolges der einzelnen Transfektionen wurden die Zellen mittels immunologischer Färbungen von Cytospins untersucht. Hierfür wurden 5×10^4 untransfizierte CHO-K1-Zellen und der mit 225-IgA1- und 225-IgA2-transfizierten CHO-K1-Zellen bzw. der CHO-K1-Doppeltransfektanten für 225-IgA1 und der J-Kette mittels Zentrifugalkraft auf einen Objektträger aufgebracht. Verwendet wurde dafür eine Cytospin 2 Zentrifuge von Shandon. Die Zentrifugation erfolgte über 5 min bei 15000 U/min direkt auf die Objektträger. Für die Fixierung der Zellen wurde auf -20°C vorgekühltes Methanol (20% v/v) verwendet. Die Fixierung erfolgte über einen Zeitraum von 10-20 min bei -20°C . Danach folgten vier Waschschrte mit 1xPBS bei Raumtemperatur für jeweils 5 min. Für die Permeabilisierung erfolgte ein weiterer Waschschrte mit 1xPBS ergänzt mit 0,2 % TritonX-100. Es folgten 4 weitere Waschschrte mit 1xPBS. Für das Blocken unspezifischer Bindestellen wurden 50 μl Mausserum 1 h auf den Zellen inkubiert. Die erste Färbung erfolgte mit den folgenden Antikörpern: ein monoklonaler Maus Antikörper gegen die humane α -Kette FITC-gekoppelt, um in den Transfektanten für IgA1 und IgA2 deren Expression nachzuweisen und ein muriner monoklonaler PE-gekoppelter Penta-Histidin Antikörper, um in der Doppeltransfektanten die J-Kette nachzuweisen. Jeweils 50 μl einer 1:100 Verdünnung dieser Antikörper wurden für 1 h bei Raumtemperatur auf den Zellen platziert. Danach wurde viermal mit 1xPBS gewaschen. Mit der zweiten Färbung mittels DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol, Dianova) wurden 50 μl einer 1:10000 verdünnten DAPI-Lösung für 30 Minuten auf den Zellen inkubiert. Ab diesem Schritt war auf ständige Dunkelheit zu achten. Es folgten die 4 letzten Waschschrte mit 1xPBS. Die Zellen wurden mit Eindeckmedium überschichtet und ein Deckglas aufgelegt. Danach wurden die gefärbten Zellen mittels eines Fluoreszenzmikroskops (Axio Imager 1.0, Zeiss) untersucht. Die Ergebnisse wurden mit einer AxioCam MR-Kamera aufgenommen.

2.2.1.7. Durchflusszytometrische Analysen

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde eine Reihe von durchflusszytometrischen Analysen durchgeführt. Prinzipiell können hierbei direkte und indirekte Immunfluoreszenzen unterschieden werden. Bei der direkten Detektion wurde ein Fluorochrom-markierter Primärantikörper verwendet, während bei den indirekten Analysen ein Primärantikörper eingesetzt und dieser durch einen Fluorochrom-markierten Sekundärantikörper nachgewiesen wurde. In der Tabelle 5 sind die Versuchsbedingungen zusammengefasst dargestellt.

Zwischen den einzelnen Schritten und abschließend wurden die Zellen mit jeweils 100 µl FACS-Puffer gewaschen und schließlich in 500 µl 1xPBS aufgenommen und im Durchflusszytometer analysiert. Für die Waschschrte wurden die Zellen 3 min bei 1700 U/min zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in der entsprechenden Primär- oder Sekundärantikörper-Lösung resuspendiert (siehe Tab. 4).

Für die Berechnung der Ergebnisse wurden folgende Formeln herangezogen: Relative Fluoreszenzintensitäten (RFI) wurden berechnet als Ratio von Durchschnittsfluoreszenzintensität von relevanten zu irrelevanten Antikörpern. Die Formel für die Berechnung des Ausmaßes der Epitopüberlappung: % Konkurrenz = $(\text{experimentelle MFI} - \text{Hintergrund-MFI}) / (\text{maximale MFI} - \text{Hintergrund-MFI}) \times 100$. Die Berechnungsformel für die C1q-Anlagerung lautete: % Konkurrenz = $(\text{experimentelle MFI} - \text{Hintergrund-MFI}) / (\text{maximale MFI} - \text{Hintergrund-MFI}) - 100$, wobei maximale MFI definiert wird als MFI bei Kombination des FITC-konjugierten EGF-R Antikörpers mit einem Isotyp-Kontroll-Antikörper (HuMab-KLH). Die Verdrängung des Liganden wurde mit folgender Formel berechnet: % Inhibition der EGF-Bindung = $(\text{RFI ohne Antikörper} - \text{RFI mit Antikörper}) / (\text{RFI ohne Antikörper}) \times 100$.

Charakterisierung rekombinanter IgA-Antikörper gegen den EGFR
- Materialien und Methoden -

Tabelle 4: Zusammenfassung der einzelnen Versuchbedingungen der durchflusszytometrischen Analysen.

Versuch	Zielzelle (Anzahl)	Primär-antikörper	Sekundär-antikörper (1:10 Verdünnung)	Inkubationszeiten
Direkte Immunfluoreszenzen				
Nachweis von CD89/CD16a	BHK21 CD89+/ CD16a+ (1,5x10 ⁵)	CD89/CD16a-FITC	-	1h bei 4 °C
Liganden- (EGF-) Verdrängung	A431 (1,5x10 ⁵)	EGF-FITC ± EGF-R Antikörper im 200fachen Überschuss	-	1h bei 4 °C
Epitopüberlappung	A431 (1,5x10 ⁵)	018/003/005/425-FITC, EGF-R IgG/IgA 200facher Überschuss	-	1h bei 4 °C
Indirekte Immunfluoreszenzen				
Bindung an EGF-R	A431 (1,5x10 ⁵)	EGF-R-IgG/IgA-Antikörper, Kontrollantikörper	Ziege-anti-human-kappa-FITC	Jeweils 1h bei 4 °C
Bindung an CD20	Raji (1,5x10 ⁵)	EGF-R-IgG/IgA, Rituximab	Ziege-anti-human-kappa-FITC	Jeweils 1h bei 4 °C
Bindung an FcαRI/ FcγRIIIa	BHK-21 CD89+/ CD16a+ (1,5x10 ⁵)	EGF-R IgG/IgA-Antikörper, Kontrollantikörper	Ziege anti-human-kappa-FITC / polyklonaler Kaninchen-anti-human-IgA-FITC	Jeweils 1h bei 4 °C
Isotypkontrolle	A431 (1,5x10 ⁵)	EGF-R IgA1-/IgA2-Antikörper	Maus-anti-human-IgA1-/IgA2-FITC	Jeweils 1h bei 4 °C
Nachweis der J-Kette (Einzel-färbung)	A431 (1,5x10 ⁵)	IgA1±J, Maus-anti-Penta-Histidin-Markierung	Ziege-anti-Maus-IgG-FITC	Jeweils 1h bei 4 °C
Nachweis der J-Kette (Doppel-färbung)	A431 (1,5x10 ⁵)	dIgA1+J (100 µg/ml)	polyklonaler Kaninchen-anti-human-IgA-FITC + Maus-anti-Penta-Histidin-Markierung-PE	Jeweils 1h bei 4 °C
Nachweis des plgR auf MDCK	MDCK ± plgR (2x10 ⁵)	Maus-anti-Human Secretory Component (SPM217)	Ziege-anti-Maus-IgG-FITC	Jeweils 1h bei 4 °C Wichtig: Zellen nicht abtrypsinieren sondern abschaben
C1q Anlagerung	A431 (1,5x10 ⁵)	EGF-R-IgG/IgA	Maus-anti-Human-C1q-FITC	1. 15 min bei RT 2. 10 min bei 37 °C nach Zugabe des Serums 3. Sek. AK 1h bei 4 °C

2.2.2. Antikörperproduktionssysteme

2.2.2.1. Hybridomkulturflaschen

Bei diesem System wurden die Transfektanten ab einer Zellzahl von 5×10^5 Zellen/ml in einem Volumen von 25 ml CD-CHO-Select in große Hybridomkulturflaschen (Greiner Bio one, 175 cm², Abb. 14 A) ausgesät und über zwei Wochen kultiviert. Danach wurde die Zellsuspension abzentrifugiert, das Pellet in 25 ml Medium aufgenommen und erneut ausgesät. Um ausreichende Ausbeuten mit diesem System zu ermöglichen wurden 20-40 Flaschen pro Konstrukt parallel inokuliert.

2.2.2.2. Miniperm System

Für die Produktion der Antikörper wurden als zweites System Bioreaktoren in Form von Rollerflaschen, so genannte Miniperm Reaktoren (Millipore, Abb. 14 B), verwendet. Das Prinzip dieser Rollerflaschen beruht auf der Teilung in zwei durch eine semipermeable Membran getrennte Kompartimente. Das kleinere dieser beiden Kompartimente stellt den eigentlichen Bioreaktor dar. In einem Volumen von 35 ml werden 1×10^6 CHO-Zellen pro ml inokuliert. Dem gegenüber steht ein Versorgungskompartiment mit einem Volumen von 500 ml. Mittels einer 50 ml Spritze wurde die Zellsuspension in den Bioreaktor überführt. In das Versorgungsmodul wurden 450 ml CD-CHO-Select eingefüllt. Nach Verschließen der Module wurden die Reaktoren auf dem Roller platziert und für sieben Tage bei 37°C und 5% v/v CO₂ inkubiert. Durch das Rotieren der Flaschen werden die Zellen ständig ausreichend mit Nährstoffen versorgt, eine optimale Raumausnutzung ermöglicht und auf der anderen Seite der produzierte Antikörper im Bioreaktor aufkonzentriert. Am siebten Tag wurde das Versorgungsmedium verworfen. Die Zellsuspension wurde aus dem Bioreaktor mittels einer 50 ml Spritze entfernt. Die Zelldichte wurde mittels Trypanblaufärbung bestimmt (siehe 2.2.1.1.), und von der Suspension 35×10^6 Zellen in frischem 35 ml CD-CHO-Select aufgenommen reinokuliert. Nach Auffüllen des Versorgungsmoduls erfolgte eine weitere Inkubation für sieben Tage.

2.2.2.3. Celine CL1000 System

Dieses Celine CL1000 System (Sartorius, Abb. 14 C) beruht auf dem gleichen Prinzip wie die Miniperm Rollerflaschen. Es handelt sich um ein stehendes Flaschensystem mit einem geringeren Bioreaktorvolumen (20 ml) und einem größeren Versorgungsmodul (1 Liter). Die Transfektanten wurden in 175 cm²

Kulturflaschen angezogen, um eine Zellzahl von 1×10^8 Zellen zu erreichen. In diesem System wurden initial 5×10^6 Zellen pro ml ausgesät, das entsprach einer Gesamtzellzahl von 1×10^8 Zellen. Diese Zellsuspension wurde in den Bioreaktor überführt. Das Versorgungskompartment wurde mit 500 ml CD-CHO-Select befüllt. Nach einer Inkubationsphase von sieben Tagen wurde das Versorgungsmedium verworfen, die Zellsuspension entnommen und Zelldichte bestimmt (siehe 2.2.1.1.). Anschließend wurden erneut 1×10^8 Zellen inokuliert. Ebenso wie beim Miniperm System wurden auch hier siebentägige Produktionsrhythmen verfolgt. Die aus den Bioreaktoren entnommenen Zellsuspensionen wurden zentrifugiert (10 min 4000 U/min) und die Überstände anschließend in Flaschen (Stericup mit Steritop, Millipore) sterilfiltriert und bei 4°C im Kühlschrank gelagert.



Abbildung 14: Produktionssysteme zur Herstellung der rekombinanten Antikörper: (A) Hybridom-zellkulturflaschen von Greiner bio one, (B) Miniperm Rollerflaschen von Millipore und in (C) das Celline CL1000 System von Sartorius.

2.2.3. Biochemische Methoden

2.2.3.1. Bestimmung der spezifischen Produktionsrate mittels ELISA

Die Bestimmung der Konzentrationen der Antikörper in den Überständen der einzelnen Produktionsflaschen wurde mittels eines klassischen Sandwich-ELISA ermittelt: Im ersten Schritt wurden 8-Well-Streifen (Nunc Immunosorp), welche optisch aktiv sind, für 24 h mit 100 µl eines polyklonalen Antikörpers gegen die humane κ -Leichtkette (Caltac) in einer 1:1000 Verdünnung in 1xPBS bei 4°C beschichtet. Alle folgenden Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Es folgten drei Waschschrte mit einem Waschpuffer aus 1xPBS komplettiert mit 3 % BSA und 0,05 % Tween20. In jedes Well wurden 100 µl 1xPBS vorgelegt. Danach erfolgte die einstündige Inkubation mit Verdünnungsreihen der einzelnen Überstände im direkten Vergleich mit einer Verdünnungsreihe eines gekauften Kontroll-IgA1- bzw. -IgA2-Antikörpers mit bekannter Konzentration zur Generierung einer

Standardkurve. Nach dreimaligem Waschen erfolgte die Detektion mit einem polyklonalen Antikörper gegen humane IgA-Antikörper (Sigma), welcher 1:10000 verdünnt worden war. Die Inkubation mit 100 µl dieser Lösung dauerte 1 h. Anschließend wurden ungebundene Antikörper durch intensives Waschen entfernt. Der nächste Schritt bestand in der Zugabe von 200 µl des Substrats (*o*-Phenylenediamine dihydrochloride). Die Umsetzung des Substrates durch die Peroxidase dauerte 15-20 min, danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 75 µl 3 molarer Salzsäure gestoppt. Die Absorption wurde in einem Absorptionsleser bei 492 nm Wellenlänge gemessen. Die Bestimmung der spezifischen Produktionsraten (SPR) erfolgte nach unterschiedlichen Verfahren in Abhängigkeit davon, in welchem System die Zellen wuchsen. Das Protokoll für die Hybridom-Kulturflaschen sah vor, dass in einer Dichte von 1×10^5 pro ml die Zellen in 6-Well-Platten ausgesät wurden. Nach drei Tagen Kultivierung wurden die Überstände gewonnen und die Antikörperkonzentrationen zum Zeitpunkt 0 und nach drei Tagen mittels Sandwich-ELISA bestimmt. Ebenso wurde die Zellzahl bestimmt. Im Falle der Bioreaktoren mussten die Zellen unter den entsprechenden Bedingungen gehalten werden. Dazu wurden 1×10^6 Zellen/ml bzw. 5×10^6 Zellen/ml IgA-produzierender CHO-Zellen in die Miniperm bzw. CL1000 Reaktoren ausgesät. Nach sieben Tagen Wachstum wurden aus diesen Reaktoren Proben für die Bestimmung der Konzentration von Antikörper und der Zellzahl entnommen. Die Analysen fanden als technische Triplikate statt. Die SPR wird angegeben in Picogramm pro Zelle pro Tag [pg/Zelle/Tag], und ist eine Funktion abhängig von der Antikörperkonzentration und dem Zellwachstum vor und nach dem Messungszeitraum. Grundlage für die Berechnungen war folgende Formel: $SPR = qP = \text{Gesamtproteinmenge} / \text{Integral Cell Area (ICA)}$; $ICA = ((\text{finale Zellzahl} - \text{initiale Zellzahl}) \times \text{Tage der Kultivierung}) / \log(\text{finale Zellzahl} / \text{initiale Zellzahl})$.

2.2.3.2. Methoden zur Antikörperaufreinigung

Für alle Aufreinigungsschritte wurde das „ÄKTAprime liquid chromatography system“ (Amersham Biotech) verwendet. Während des Laufs können mittels der Unicorn 4.11 Software UV-Absorption, pH-Wert und Konduktivität kontinuierlich gemessen, analysiert und aufgenommen werden.

2.2.3.2.1. Affinitätschromatographie mittels ahu- κ -Matrix

Für die Aufreinigung der IgA-Antikörper aus dem Überstand wurde eine neue und einfache Strategie entwickelt. Bei der Affinitätschromatographie handelt es sich um ein chromatographisches Trennverfahren, um aus einer Lösung von Stoffen einen einzigen oder eine Gruppe dieser über deren Spezifität oder Bindungseigenschaften aufzureinigen. Hierbei wird die Lösung über eine stationäre Phase, bestehend aus quervernetzter Agarose (Sepharose) geführt, an die der Ligand bindet und durch anschließende Elution isoliert werden kann. In dieser Arbeit kam eine Matrix zum Einsatz, welche aus an Sepharose Kügelchen geknüpfte Kamelantikörperfragmente gegen die humane κ -Leichtkette bestand (im Folgenden kurz als ahukappa-Matrix). Mit dieser Matrix wurden XK16-Säulen gepackt. Hierfür wurden die Bestandteile der Säulen zunächst gründlich mit destilliertem Wasser und reinem Ethanol gereinigt, zusammgebaut und dann erneut mit 20 % Ethanol gespült. Die folgenden Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Die ahukappa-Matrix wurde mit einer serologischen Pipette in die Säule überführt. Die Schläuche der Pumpe wurden jeweils 10 min mit 1 % NaOH, destilliertem Wasser und 1xPBS gespült. Auf die Säule wurden 10 ml 1xPBS aufgeschichtet. Durch das Öffnen des unteren Ventils konnte die Flüssigkeit ablaufen, was zur zunehmenden Verdichtung der Matrix führt. Nach mehrmaligem Spülen der Säule wurde der Stempel bis zum oberen Ende der Matrix eingedreht und die Säule an das Pumpsystem angeschlossen. Die gepackte Säule wurde noch einmal mit 5 Säulenvolumen (je 5 ml 1xPBS) gespült. Danach konnte das System luftfrei verschlossen werden. Für die Aufreinigung wurde die Säule an das HPLC-System angeschlossen. Die Äquilibrierung der Säulen geschah mit 5 Säulenvolumen 1xPBS. Die Beladung der Säule mit dem Antikörper erfolgte bei einer Flussrate von 1 ml/min mit dem dreifachen Volumen der Antikörperlösung bzw. des Überstandes. Die Elution erfolgte ebenfalls mit einer Flussrate von 1 ml/min und mit 5 Säulenvolumen eines sauren Elutionspuffers (0,1 M Glycin, pH 2,0). Um den pH Wert des Eluats auszugleichen, wurde in den Fraktionsröhrchen 2 ml Neutralisierungspuffer (1 M Tris, pH 8,9) vorgelegt.

2.2.3.2.2. Immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie (IMAC)

Bei der Aufreinigung von dimerem IgA wurde im Anschluss an die ahukappa-Aufreinigung eine zweite Affinitätschromatographie durchgeführt. Da die klonierte J-Kette über eine Penta-Histidin-Markierung verfügte, konnte dimeres und polymeres

IgA mit inkorporierter J-Kette über eine immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) aufgereinigt werden. Dabei wurden Säulen mit an Sepharose-Kügelchen durch Chelatkomplexe gebundenem Nickel verwendet. Für die Aufreinigung über diese fertig gepackten und gekauften Nickel-NTA-Säulen (GE Healthcare) musste das Eluat der ahukappa-Aufreinigung gegen den Bindungspuffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8) dialysiert werden. Dafür wurde das Eluat mit der dreifachen Menge an Bindungspuffer vermengt und in einen im Bindungspuffer äquilibrierten Dialyseschlauch überführt. Der gefüllte Schlauch wurde dreimal in jeweils 10 Liter Bindungspuffer für 24 h bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Anschließend wurde das Dialysat entnommen und steril filtriert. Zu Beginn der Aufreinigung wurde die Säule mit dem Bindungspuffer äquilibriert, wonach die Säule mit dem dreifachen Volumen des Dialysates beladen wurde. Im Anschluss erfolgte die Elution mit dem Elutionspuffer, der 250 mM Imidazol enthielt. Die Äquilibration, Beladung und Elution erfolgte mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/ml. Imidazol ist ein Histidin-Analogon. Im Bindungspuffer ist Imidazol enthalten, um unspezifische Bindungen von histidinreichen Sequenzen an das chelatgebundene Nickelion zu vermeiden. Im Elutionspuffer befindet sich ein Überschuss an Imidazol, um die gebundene Penta-Histidin-Markierung des Antikörpers zu verdrängen. Anschließend musste das Eluat wieder gegen 1xPBS dialysiert werden. Nachdem dimeres und polymeres IgA nun über die IMAC-Säule isoliert werden konnten, erfolgte die Separation von diesen über die Gelfiltrationssäule (siehe 2.2.3.2.3.), wodurch reines monomeres und dimeres IgA aufgereinigt werden konnte.

2.2.3.2.3. Gelfiltration

Bei der Aufreinigung von monomerem und dimerem IgA erfolgte im nächsten Schritt eine Aufkonzentrierung des Eluats mit Vivaspin 100000 MWCO Zentrifugalkraftkonzentratoren, da auf die Gelfiltrationssäule (Superdex200 26x60) im Anschluss aus technischen Gründen ein maximales Volumen von nur 2 ml auftragen werden konnte. Diese Aufkonzentrierung dauerte mehrere Tage und wurde bei 4°C und 1000 U/min durchgeführt. Dabei wurden jeweils 14 ml der Eluate aus den vorangegangenen Aufreinigungen in einen Konzentrator überführt und bei 4°C und 1000 U/min aufkonzentriert. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt, bis die Eluate auf maximal 10 ml reduziert waren. Bei der anschließenden Gelfiltration stellte der

Bindungs- und Elutionspuffer 1xPBS dar. Die Superdex200 26x60 und 10x30 Säulen wurden mit dem fünffachen Säulenvolumen mit 1xPBS äquilibriert. Über eine 2 ml Schleife wurde der Antikörper manuell in das System eingeführt. Nachdem die Schleife mit 3 ml 1xPBS geleert wurde lief der Antikörper mit einer Flussrate von 1 ml/ml über die Säule. Die Fraktionierung erfolgte über Proteinbestimmung durch eine dazwischen geschaltete UV_{280nm}-Absorptionsmessung. Um bei dieser Gelfiltration die Proteingrößen abschätzen zu können, wurden Vorversuche mit einem HMW-Gelfiltration-Kalibrierungskit, dem 225.IgG1 und einem gekauften Kontroll-IgA1 unternommen. Hierbei wurden jeweils 500 µg des jeweiligen Proteins aufgetragen. Anhand der Elutionsprofile dieser Referenzproteine wurde das Laufverhalten der hergestellten IgA-Antikörper abgeschätzt. Mit Hilfe dieser Gelfiltration konnte monomeres und dimeres IgA von polymerem und aggregiertem IgA sowie Fragmenten getrennt werden.

2.2.3.3. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration des Antikörpers wurde mit verschiedenen Methoden bestimmt, je nachdem ob der Antikörper im Überstand oder in aufgereinigtem Zustand vorlag. Für die Konzentrationsbestimmung des aufgereinigten Antikörpers wurden drei verschiedene Methoden angewendet: Zunächst wurde die Proteinmenge über UV_{280nm}-Absorption bestimmt. Entsprechend dem Beer-Lambert-Gesetz erfolgte die Berechnung der Konzentration mittels eines Umrechnungsfaktors von 1,3, durch den der Mittelwert der drei UV_{280nm}-Messungen geteilt wurde. Als nächste Methode wurde ein BCA Protein Assay Kit (Pierce) mit einer BSA-Standardkurve entsprechend dem Herstellerprotokoll benutzt. Als dritte Methode wurde eine automatisierte Kapillargelelektrophorese (Experion Pro260, Bio-Rad) verwendet. Die Proben wurden entsprechend dem Herstellerprotokoll präpariert. Als Kontrollproteine dienten in diesem Fall Cetuximab und gekaufte unspezifische IgA1/IgA2-Antikörper. Die Experion Software berechnet sowohl die Proteinkonzentration als auch die Reinheit der aufgetragenen Proben auf der Basis von internen Standards im Probenpuffer.

2.2.3.4. Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

2.2.3.4.1. Native PAGE

Für native Gele wurde das NativePAGE Novex Bis-Tris Gel System inklusive Pufferlösungen und 4-16% Bis-Tris-Gele und das mitgelieferte Protokoll des

Herstellers (Invitrogen) verwendet. Dieses System beinhaltet auch die Im-Gel-Coomassie Färbung, bei der Proteine durch Coomassie im Proben- und Kathodenpuffer gefärbt werden. Im Anschluss folgte dann die Entfärbung mittels Entfärbungspuffer.

2.2.3.4.2. Denaturierende Gele

Für denaturierende Gele wurden 3-8% Tris-Acetat-Gele (Invitrogen) verwendet. Für die Gelelektrophorese wurden die Proben in 20 µl 1xPBS verdünnt. Anschließend wurden 5 µl 5-fach Laemmli-Puffer dazugegeben. Nach kurzem Vortexen und Abzentrifugieren wurden die Proben für 4 min bei 95°C erhitzt und anschließend auf die Gele aufgetragen. Die Gele liefen bei 80 mV für 150 min.

2.2.3.4.3. Silberfärbung

Für die Silberfärbung der Gele wurde das Roti-Black-P Kit (Roth) und das darin enthaltene Protokoll benutzt. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine mittels einer Fixierlösung aus Eisessig und Ethanol im Gel fixiert und das Gel anschließend in einer Silbernitratlösung inkubiert wird. Dabei lagern sich die positiven Silberionen an negativ geladene Gruppen der Proteine an. Durch die folgende Behandlung mit alkalischem Formaldehyd reduzieren die Silberionen zu elementarem Silber und färben dadurch die Proteinbanden schwarz. Diese Methode ist im Vergleich zur Coomassie Färbung deutlich sensitiver, da auch schon Proteinmengen von 0,1-1 ng detektiert werden können. Von den einzelnen Antikörpern wurden jeweils 200 ng aufgetragen.

2.2.3.5. Elektrotransfer

Für die Immundetektion der Proben wurden diese auf Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membranen übertragen. Zunächst wurden vier Lagen Filterpapier in Anderson-Puffer eingeweicht. Die PVDF-Membran wurde kurz in Methanol aktiviert und anschließend ebenfalls in Anderson-Puffer eingelegt. Da die Proteine aufgrund ihrer Ladung von der Kathode zur Anode wandern, wurde der Blot in der Sequenz zweimal Filterpapier, Membran, Gel (siehe 2.2.2.4.2.) und zweimal Filterpapier zusammengebaut und in der Elektrotransferkammer zwischen Kathode und Anode eingespannt. Der Elektrotransfer lief bei 0,1 A/Gel für 105 min. Nach dem Transfer wurde die Membran in 1xPBS eingelegt und bei 4°C aufbewahrt.

2.2.2.6. Immundetektion

Die Immundetektion verlief in Abhängigkeit des zu detektierenden Epitops nach unterschiedlichen Protokollen. Diese werden in der folgenden Tabelle 5 zusammengefasst. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Tabelle 5: Protokoll zur Immundetektion von Proteinen auf PVDF-Membranen

Immundetektion (Angaben pro 25 ml Lösung)	Direkte Färbung (ahu-κ/ahulgA/ahulgG-POX/HRP)	Indirekte Färbung (Penta-Histidin-Markierung, Sekretorische Komponente)
Blocken (eine H)	3,2% BSA*, 2% MMP***	3% BSA
Waschen (je 10 min)	-	Zweimal Puffer 3 Einmal 1xTBS***
1. Färbung (eine H)	ahu-κ: 1% BSA 2% MMP, AK 1:2500 ahulgA: 2% BSA, 1% MMP, AK 1:10000 ahulgG: 2% BSA, 2% MMP, AK 1:5000	3% BSA, AK 1:2500
Waschen (je 10 min)	Zweimal Puffer 2 Dreimal Puffer 1 Einmal 1xTBS	Zweimal Puffer 3 Einmal 1xTBS
2.Färbung (eine H)	-	5% MMP, AK: 1:2500
Waschen (je 10 min)	-	Viermal Puffer 3 Einmal 1xPBS
Detektion 4 Minuten	2 ml einer 1:1 Mischung aus Substrat und Verstärker (Chemolumineszenz Kit), nach 4 min in Sichtfolie einspannen und Signale dokumentieren	

*BSA Bovines Serumalbumin, **MMP Magermilchpulver, ***TBS Tris Buffered Saline

2.2.4. Funktionale Charakterisierung der Antikörper

2.2.4.1. Zellviabilitätstest

Um den direkten Effektmechanismus der Wachstumsinhibition zu untersuchen, wurden mit dem humanen EGF-R transfizierte BaF3 B-Lymphom-Zellen (Peipp 2008), dem humanen Kolonkarzinomzellmodell DiFi und dem Plattenepithelzellkarzinom A431 drei verschiedene Zellmodelle verwendet. Die BaF3-Zellen wachsen üblicherweise abhängig von Interleukin-3 (IL-3). Transfektanten für den humanen EGF-R, die in der Arbeitsgruppe vorhanden waren, sind in der Lage, auch abhängig vom epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) zu wachsen. Unter dieser Bedingung konnte getestet werden, ob die EGF-R-Antikörper in der Lage sind, das Wachstum der Zellen zu inhibieren. Der Nachweis beruhte hierbei auf der Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen. Die Aktivität dieser Enzyme steht in direktem Zusammenhang mit der Viabilität der Zellen, da nur lebende und wachsende Zellen

das Substrat „3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium inner salt“ (MTS) in Kombination mit dem Elektronenkopplungsreagenz „Phenazine Methosulfat“ (PMS) in das anders farbige Formazan umsetzen können. Zu Beginn wurden Suspensionszellen oder abtrypsinierte adhärenente Zellen für 5 min bei 1600 U/min zentrifugiert. Wichtig war es die Zellen dreimal mit ihrem Medium zu waschen. Bei den BaF3-Zellen wurde hierbei serum- und IL-3-freies Medium verwendet und stattdessen humaner EGF (10 ng/ml) zugegeben. 100 µl Zellsuspension wurden pro Well in 96-Well-Flachboden-Platten pipettiert. Die Zellen wurden daraufhin mit steigenden Konzentrationen (0,02; 0,1; 0,5; 2,5; 10; 25; 50; 100 µg/ml) der Antikörper über drei Tage im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Inkubationsphase wurden 25 µl Substrat (MTS) zugegeben. Nach einer Entwicklungszeit von 20-60 min wurde die Farbreaktion in einem Absorbationsmessgerät bei 570 nm Wellenlänge detektiert. Die Formel für die Berechnung der Ergebnisse lautet: (Absorption in der Anwesenheit eines EGF-R Antikörpers/Absorption in Anwesenheit eines unspezifischen Antikörpers) x 100.

2.2.4.2. Transzytose

Für den Transzytosestest wurden für den humanen polymeren Immunglobulin Rezeptor (pIgR)-positive MDCK- (siehe 2.2.1.1. und 2.2.1.5.) und Calu3-Zellen, ein humanes Karzinom der oberen Bronchialepithelien, verwendet. Abbildung 5 veranschaulicht den schematischen Aufbau des Transzytoseassays. Zu Beginn des Versuches wurden die Zellen abtrypsiniert und 5×10^4 Zellen auf porösen Filtereinsätzen ausgesät. Die MDCK-Zellen mussten drei bis vier Tage und die Calu3-Zellen 7 Tage wachsen, um eine dichte Schicht aus polarisierten Zellen zu bilden. Nach 96 h im Falle der MDCK-Zellen und 7 Tage im Falle der Calu3-Zellen wurde die Stabilität der Monoschicht überprüft, indem der transepitheliale Widerstand (TER) mit dem Millicell-ERS Volttohmmeter entsprechend der Geräteanleitung gemessen wurde. Die Einzellschichten konnten für einen Transzytosestest verwendet werden, wenn der Widerstand einen Wert von $\geq 400/1500 \Omega$ (MDCK/Calu3) betrug. Da der Transport mittels Transzytose gerichtet vom basolateralen zum apikalen Kompartiment erfolgte, wurden 50 µg dimeres 225-dIgA1, als Spezifitätskontrolle monomeres IgA1 und als Integritätskontrolle 225-IgG1, in das basolaterale Kompartiment gegeben. Ebenso als Kontrolle für den gerichteten Transport, wurde dimeres 225-dIgA1 in das apikale Medium gegeben. Es folgte eine Inkubationsphase

von 24 h im Brutschrank bei 37°C und 5% v/v CO₂. Die Überstände beider Kompartimente wurden anschließend entnommen, und der Erfolg der Transzytose inklusive Kontrollen und die Inkorporation der sekretorischen Komponente in das dimere IgA1 mittels Immundetektion nachgewiesen (siehe 2.2.2.6.). In Abbildung 15 wird der Versuchsaufbau für den Transzytostest schematisch dargestellt.

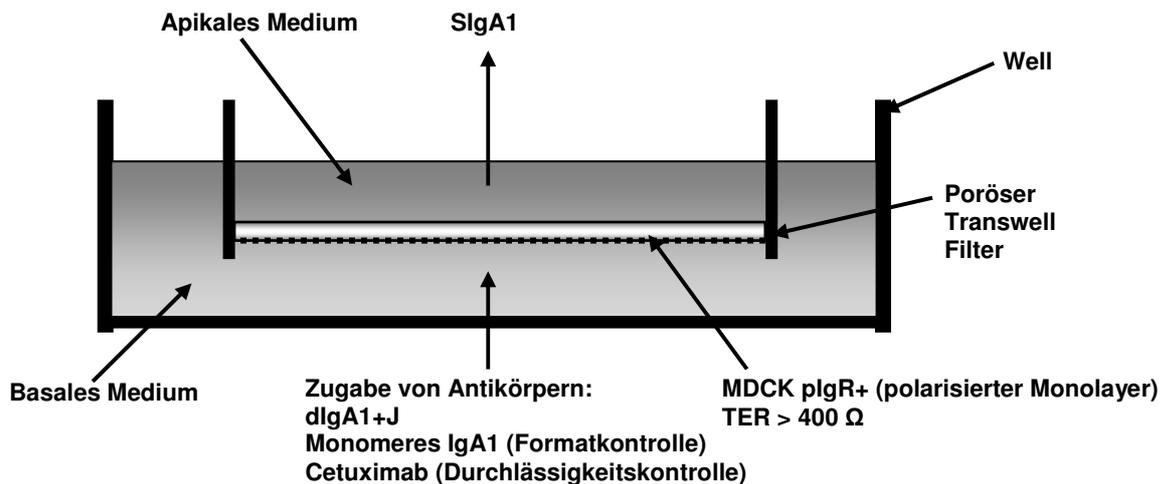


Abbildung 15: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus für den Transzytostest. Die plgR-positive MDCK-Zellen wurden auf einem porösen Transwell-Filter ausgesät. Bei einem TER-Wert von über 400 Ω wurden die Antikörper basolateral dazugegeben. Der humane plgR transportiert dimeres IgA1 zur apikalen Seite. Dabei wird die SC in das dimere IgA1 inkorporiert.

2.2.4.3. Antikörper abhängige Zytotoxizität (ADCC, CDC)

Für den Nachweis, dass Antikörper ADCC bzw. CDC vermitteln können, wurde neben frischem unbehandeltem Spenderblut auch daraus frisch isolierte Effektorzellen bzw. Plasma benötigt (Isolierung siehe 2.2.1.2.). Die Effektoren wurden mit den Antikörpern mit steigender Konzentration (finale Konzentrationen von 10, 2, 0,4, 0,08 und 0,016 µg/ml) und Zielzell-Medium auf 96-Well-Rundboden-Platten vorgelegt. Die Zielzellen (A431/DiFi/A1207/Raji) wurden, wenn nicht in Suspension, abtrypsiniert, gezählt und $0,6 \times 10^6$ Zellen pro Versuchsplatten in ein Falcon überführt. Die Zielzellen wurden danach mit einem radioaktiven Isotop, ⁵¹Chrom, für 2 h im Brutschrank inkubiert, wobei dieses über ein Transporterprotein aufgenommen wurde. Nach 2 h und dreimaligem Waschen mit Kulturmedium wurden 5×10^3 Zielzellen auf die vorgelegten Antikörper oder Antikörperkombinationen und den jeweiligen Effektoren (PMN, MNC, Plasma, Monozyten) in einem Gesamtvolumen von 200 µl/Well zusammengeführt. Nach einer Inkubation über 3

(PMN, MNC, Plasma) bzw. 18 h (Monozyten) bei 37°C wurden die 96-Well-Platten mit 2000 U/min über 5 min zentrifugiert. 25 µl Überstand wurden mit 150 µl eines Szintillationsmixes (PerkinElmer) auf optisch aktiven 96-Well-Platten vermenget. Die Platten wurden mit einer optisch aktiven Folie verklebt (TopSeal-A) und anschließend für 15 min auf einem Orbitalschüttler geschüttelt. Danach wird das Ausmaß des durch Zelllyse freigesetzten ⁵¹Chrom indirekt durch das Ausmaß der durch Radioaktivität induzierten Szintillation (Szi) in einem Szintillationsmessgerät (MicroTriLux, PerkinElmer) gemessen. Die relative spezifische Lyserate wurde in Prozent ausgedrückt und berechnete sich wie folgt: % spezifische Lyse = (experimentelle Szi – basale Szi)/(maximale Szi – basale Szi) x 100. Maximale Szintillation wurde durch vollständige Lyse der Zielzellen durch eine PBS-Lösung mit 2 % TritonX erreicht und die basale „Lyse“ in Abwesenheit von Antikörpern und Effektoren gemessen. Eine unspezifische Lyse der Zielzellen durch die Effektoren alleine konnte nicht beobachtet werden. Für die Berechnung in wie weit die Antikörper in der Lage sind die Vermittlung von CDC durch eine EGF-R-IgG-Kombination zu inhibieren bzw. zu stimulieren wurden folgende Formel zur Berechnung der herangezogen: % Inhibition / Stimulation = (100 – ((100% x % spezifische Lyse der Dreifachkombination)/ % spezifische Lyse der Zweifachkombination))) x (-1).

2.2.5. Kalkulation und Darstellung der Daten und statistische Analysen

Für die graphische Aufbereitung der Daten sowie die statistischen Analysen wurde die GraphPad Prism 4.0 Software verwendet. Daten werden präsentiert als Mittelwerte mit Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Signifikanzen wurden mit gepaartem bzw. ungepaartem t-Test berechnet. Als statistisch signifikant galten Ergebnisse mit einem p-Wert < 0,05.

3. Ergebnisse

3.1. Produktion und Charakterisierung EGFR-gerichteter IgA-Antikörper

3.1.1. Expression der Antikörper in CHO-Zellen

Die Transfektanten für 225-IgA1 und -IgA2 lagen zu Beginn der Doktorarbeit bereits vor. Im Weiteren erfolgte die Transfektion dieser IgA-exprimierenden Einzelklone mit dem pRESpuo3 Vektor, welcher die J-Kette kodiert. Die Transfektion verlief, in dem der bestproduzierende 225-IgA1 CHO-Klon mittels Lipofectamine 2000 mit dem J-Kette kodierenden Vektor transfiziert wurde. Die Transfektionseffizienz wurde durch eine Kontrolltransfektion mit einem GFP-Expressionsvektor auf $90,2 \pm 1,1 \%$ bestimmt (Abbildung kurz Abb. 16).

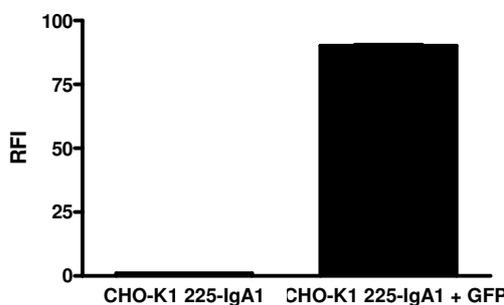


Abbildung 16: Bestimmung der Transfektionseffizienz im Durchflusszytometer. Mit GFP transfizierte Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie verglichen mit untransfizierten Zellen. Auf diese Weise lässt sich die Transfektionseffizienz berechnen.

Gut produzierende Einzelklone wurden generiert, indem 24 h nach der Transfektion mittels Puromycin der Selektionsdruck initiiert wurde und die Zellen auf 96-Well Platten in limitierender Verdünnung ausgesät wurden. Nach einem Monat wurden die angewachsenen Einzelklone mittels eines Sandwich-ELISA auf Expression von IgA und J-Kette getestet (Abb. 17).

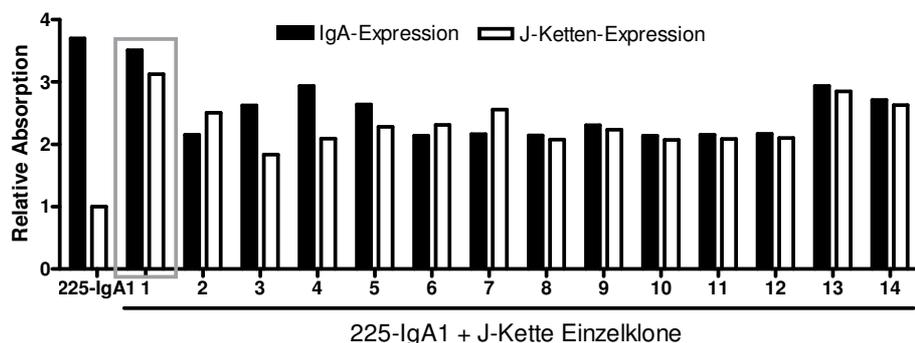


Abbildung 17: Nachweis der Expression von IgA und J-Kette der Einzelklone. Der Nachweis der Expression erfolgte mittels Sandwich-ELISA (siehe 2.2.4.1.). Die Expression der J-Kette erfolgte dabei indirekt über den Nachweis der C-terminalen Penta-Histidin-Markierung. In Relation zum unspezifischen 225-IgG1 wurde die relative Absorption berechnet. Ein Überstand des 225-IgA1 diente als Kontrolle. Gezeigt ist eine exemplarische Einzelmessung. Klon 1 (graue Umrandung) mit der höchsten Expression wurde weiterbearbeitet.

Durch eine weitere Klonierung mittels limitierender Verdünnung konnten gut produzierende Einzelklone generiert werden. Für die Transfektion der J-Kette wurden CHO-Zellen verwendet, die bereits an die Kultivierung unter serumfreien Suspensionsbedingungen adaptiert waren. Aus diesem Grund war es möglich, direkt nach der Transfektion das serumhaltige DMEM-Select gegen das serumfreie CD-CHO-Medium auszutauschen. Durch den Mediumwechsel verloren die Transfektanten ihre Adhärenz und wuchsen unter serumfreien Suspensionkulturbedingungen. Der Erfolg der Transfektionen wurde durch immunozytologische Färbungen bestätigt. Hierfür wurden die einzelnen Transfektanten mittels eines gängigen Protokolls zur immunologischen Färbung von Cytospins gefärbt (Abb. 18 und 19).

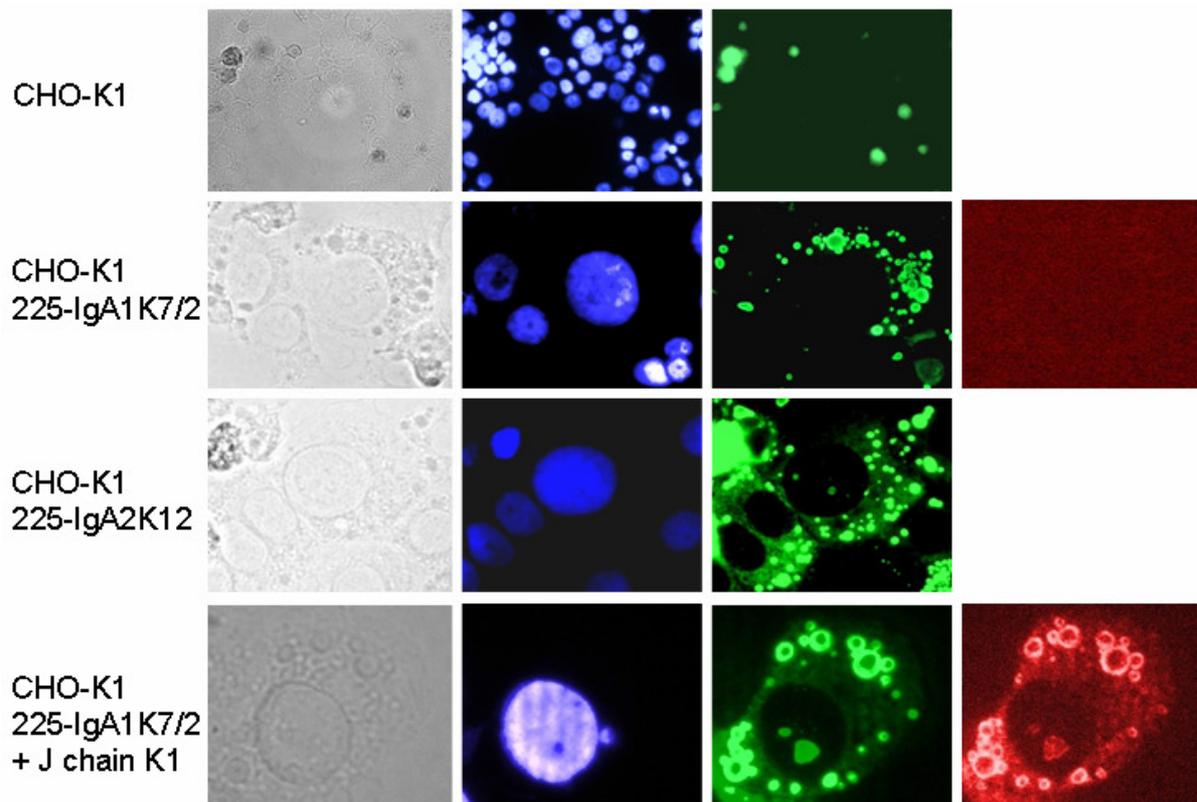


Abbildung 18: Intrazelluläre immunologische Färbungen der Transfektanten weisen die Expression der transfizierten Proteine nach. Gezeigt sind exemplarische Ergebnisse aus drei unabhängigen Färbeexperimenten. Von links nach rechts zu sehen sind Photographien im Durchlichtkanal, im blauen Filter für die DAPI-Färbung, im grünen Kanal für die ahu-IgA-FITC Färbungen und im roten Kanal für die Färbung der Penta-Histidin-Markierung (maHIS-PE). Alle Transfektanten exprimieren die zu erwartenden Antikörper bzw. die J-Kette. Im Falle der CHO-K1 Zellen gaben nur tote Zellen ein Signal.

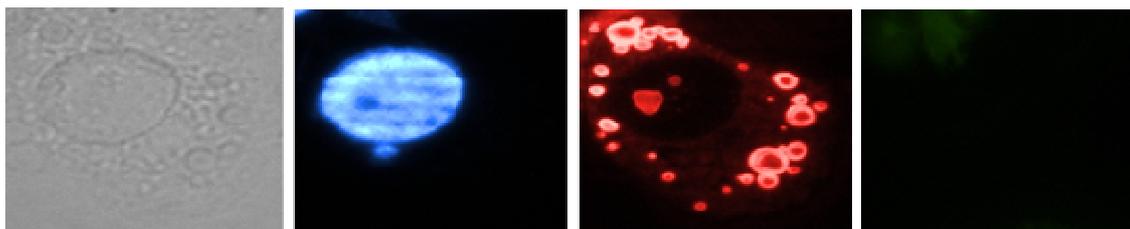


Abbildung 19: Intrazelluläre immunologische Färbungen der Doppeltransfektante. Die Transfektante für 225-IgA1 und die J-Kette wurde nur mit einem PE-gekoppelten Antikörper gegen die Penta-Histidin-Markierung der J-Kette gefärbt. Mit dieser Färbung konnte nachgewiesen werden, dass keine Überstrahlung der roten Fluoreszenz in den grünen Bereich stattfand. Gezeigt sind exemplarische Ergebnisse aus drei unabhängigen Färbexperimenten. Von links nach rechts zu sehen sind Photographien im Durchlichtkanal, im blauen Filter für die DAPI-Färbung, im roten Kanal für die Färbung der Penta-Histidin-Markierung und im grünen Kanal zum Nachweis einer möglichen Interferenz.

Nachdem die Zellen auf Objektträgern mittels Zentrifugalkraft aufgebracht und durch eine 20 %ige Methanol-Lösung bei -20°C fixiert wurden, erfolgten Färbungen mit DAPI, welches das nukleusspezifische Chromatin blau anfärbt und als Kontrollfärbung diente. Des Weiteren wurden die fixierten Zellen direkt mit einem FITC-markierten Antikörper gegen die schwere Kette von IgA-Antikörpern gefärbt. Die Transfektante für 225-IgA1 und deren Kotransfektante mit der J-Kette wurden beide im Rahmen einer Doppelfärbung mittels eines anti-IgA-FITC und eines direkt PE-gekoppeltem Antikörper gegen die C-Terminale Penta-Histidin-Markierung der J-Kette gefärbt. Durch die Permeabilisierung der Zellen mit Triton-X wurden die Antikörper bzw. die J-Kette intrazellulär gefärbt. Nach dreifacher Durchführung dieser Färbungen konnte gezeigt werden, dass die Einzelklone CHO-K1-225-IgA1-K7/2, CHO-K1-225-IgA2-K12 und die Doppeltransfektante CHO-K1-225-IgA1-K7/2-J-Kette-K1 IgA-Antikörper bzw. die Penta-Histidin markierte J-Kette produzieren. Darüber hinaus konnte auch gezeigt werden, dass die Färbung der Doppeltransfektante spezifisch war, und nicht durch eine Überstrahlung der roten Fluoreszenz erzeugt wurde (Abb. 19).

3.1.2. Produktion und Produktivität

In Rahmen dieser Doktorarbeit wurde mehrmals das Produktionssystem gewechselt, um schließlich ein geeignetes Produktionssystem für die Herstellung rekombinanter IgA-Antikörper zu finden. Ziel war es zum einen, das Ausmaß der Arbeitsschritte zu

minimieren und zum anderen höhere Produktionsraten und damit Ausbeuten zu erreichen. Am Anfang wurden die produzierenden Zellen in 75 cm² Kulturflaschen ausgesät und über einen Zeitraum von zwei Wochen kultiviert. Da die Produktionsraten und die Ausbeuten in diesem System sehr gering waren (ca. 4 µg/ml), mussten eine Vielzahl von Kulturflaschen (20-40 Stück) pro Konstrukt gleichzeitig inokuliert werden. Bioreaktoren in Form von Rollerflaschen, in denen Produktions- und Versorgungsmodul durch eine semipermeable Membran getrennt sind (Miniperm Roller Bottles, Falkenberg 1995), wurden als zweites System verwendet. Diese Flaschen waren besonders geeignet für Suspensionszellen, die in serumfreiem Medium wachsen, da die ständige Rotation der Flaschen eine gute räumliche Ausnutzung und Versorgung dieser Zellen sicherstellte. Die inokulierten $3,5 \times 10^6$ Zellen zeigten in diesem System ein verstärktes Zellwachstum von mindestens 200 % und produzierten insgesamt mehr Antikörper als ihre Pendanten in normalen Kulturflaschen. Der Grund hierfür war in den hohen Zellzahlen und dem gesteigerten Zellwachstum zu suchen, da die spezifischen Produktionsraten (SPR) zurückgingen (Tab. 6). Während die SPR in den Kulturflaschen im Mittel zwischen 0,8 und 2,2 pg/Zelle/d betragen, waren sie in den Rollerflaschen mit durchschnittlich 0,13 – 0,26 pg/Zelle/d deutlich niedriger. Reziprok dazu verhielt es sich mit den Wachstumsraten. In den Kulturflaschen zeigten die Zellen Wachstumsraten von 40,7 – 47,5 %/d. Dem gegenüber waren die Wachstumsraten in den Rollerflaschen mindestens um den Faktor 5 höher. Das Produktionsmodul umfasste ein Volumen von 35 ml. Dadurch wurde der Antikörper in einem wesentlich geringeren Volumen aufkonzentriert als in den Kulturflaschen. Konzentrationsbestimmungen mittels ELISA ergaben, dass die Konzentration des Antikörpers im Überstand der Rollerflaschen um den Faktor 10 (Tab. 6) höher war als im Überstand der Kulturflaschen. Mit dem neuen System konnten somit Mindestausbeuten von 0,7 – 2,5 mg pro Woche pro Flasche generiert werden.

Das System der Miniperm Reaktoren erwies sich als unhandlich und problematisch. Aus diesem Grund wurde das Produktionssystem Celine CL1000 (Sartorius) eingeführt. Dieses System war eine Mischung aus einer großen Kulturflasche und einem zweigeteiltem Bioreaktor. Bei diesen stehenden Produktionsflaschen wurden die Zellen in einem 20 ml Reaktor kultiviert. Über eine semipermeable Membran wurden die Zellen aus einem 1000 ml umfassenden Versorgungsmodul ständig mit frischen Nährstoffen versorgt. Auf der anderen Seite wurde der Antikörper in den 20

ml des Bioreaktors aufkonzentriert. Die ausgesäten 1×10^8 Zellen brauchten wenige Wochen, um sich an das System zu adaptieren. Sie zeigten maximale Wachstumsraten von über 1000 % im Vergleich zu den Zellen in den anderen Kultivierungssystemen. Die SPR steigerten sich bis auf ein Niveau von $1,6 \pm 0,4$ und $2,6 \pm 0,6$ pg/d/Zelle für Zellen, welche 225-IgA1 bzw. 225-IgA1 and J-Kette koexprimierten. Für 225-IgA2-exprimierende Zellen stiegen die Produktionsraten auf $1,8 \pm 0,5$ pg/d/Zelle. Die Antikörperkonzentrationen stiegen auf mittlere Werte von 261,5 und 347,3 bzw. 290,6 $\mu\text{g/ml}$ für die eben genannten IgA-Konstrukte.

Tabelle 6: Zusammenstellung der einzelnen Raten für Wachstum und Produktion bzw. Konzentration und Ausbeute der Antikörper in den verschiedenen Produktionssystemen

Antikörper	Spezifische Produktionsrate [pg/d/Zelle]			Wachstumsrate [%/d]		
	Kulturflasche	Miniperm	CL1000	Kulturflasche	Miniperm	CL1000
225-IgA1	0,8 (\pm 0,3)	0,34 (\pm 0,17)	1,6 (\pm 0,4)	47,5 (\pm 26,9)	278,6 (\pm 73,2)	910,4 (\pm 216,7)
225-IgA2	0,8 (\pm 0,2)	0,13 (\pm 0,14)	1,8 (\pm 0,5)	46,2 (\pm 21,5)	349,5 (\pm 42,3)	810,4 (\pm 125,2)
225-IgA1 + J	0,9 (\pm 0,4)	0,32 (\pm 0,11)	2,6 (\pm 0,6)	44,1 (\pm 22,3)	452,2 (\pm 35,2)	1071,2 (\pm 234,2)
Antikörper	Antikörperkonzentration [$\mu\text{g/ml}$]			Antikörperausbeute [mg/Woche/Flasche]		
	Kulturflasche	Miniperm	CL1000	Miniperm	CL1000	
225-IgA1	4,0 (\pm 1,1)	44,8 (\pm 16,5)	200,8 (\pm 73,3)	1,7 (\pm 0,6)	6,2 (\pm 1,5)	
225-IgA2	4,7 (\pm 0,1)	71,5 (\pm 54,9)	290,6 (\pm 136,7)	2,5 (\pm 1,9)	6,1 (\pm 1,4)	
225-IgA1 + J	4,2 (\pm 1,3)	34,5 (\pm 11,4)	295,2 (\pm 139,5)	2,1 (\pm 0,4)	7,9 (\pm 1,4)	

In Abbildung 20 sind die spezifischen Produktionsraten der CHO-K1 Transfektanten für 225-IgA1 und -IgA2 und die Zunahme der Antikörperkonzentration im Überstand über einen Zeitraum von sechs Monaten in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Diese Kurven zeigen, dass die Zellen nach der Inokulierung eine Adaptionsphase durchliefen. In dieser Phase stiegen die Wachstums- und Produktionsraten (Tab. 1 und Abb. 20 und 21). Die Bestimmung der Antikörperkonzentrationen im Überstand mittels Sandwich-ELISA lieferten als Ergebnis, dass nach den ersten 4-6 Wochen mit einer durchschnittlichen Konzentration von 200-300 $\mu\text{g/ml}$ zu rechnen war. Auch im Falle der spezifischen Produktionsrate (SPR, Berechnung siehe 2.2.3.1.) konnte

gezeigt werden, dass diese in den ersten 4-6 Wochen angestiegen war. Anders als bei der Konzentration war trotz Schwankungen eine weitere Steigerung der SPR zu verzeichnen. Somit konnte durch die Kultivierung in den CL1000 Produktionsflaschen die Produktivität der Transfektanten erhöht werden. Diese Ergebnisse ließen sich sowohl für 225-IgA1- und 225-IgA2-produzierende Zellen sowie für die Doppeltransfektante (225-IgA1 und J-Kette) zeigen. In allen Fällen konnten erhöhte Werte bezüglich spezifischer Produktionsrate, Wachstumsrate und Ausbeute gemessen werden (Abb. 20 und 21).

Zusammenfassend wurden mit diesem Produktionssystem die Mindestausbeuten von durchschnittlich 7 mg pro Woche pro Flasche generiert. In der Spitze ließen sich zwischen 8-9 mg pro Konstrukt pro Woche pro Flasche auf diese Weise herstellen.

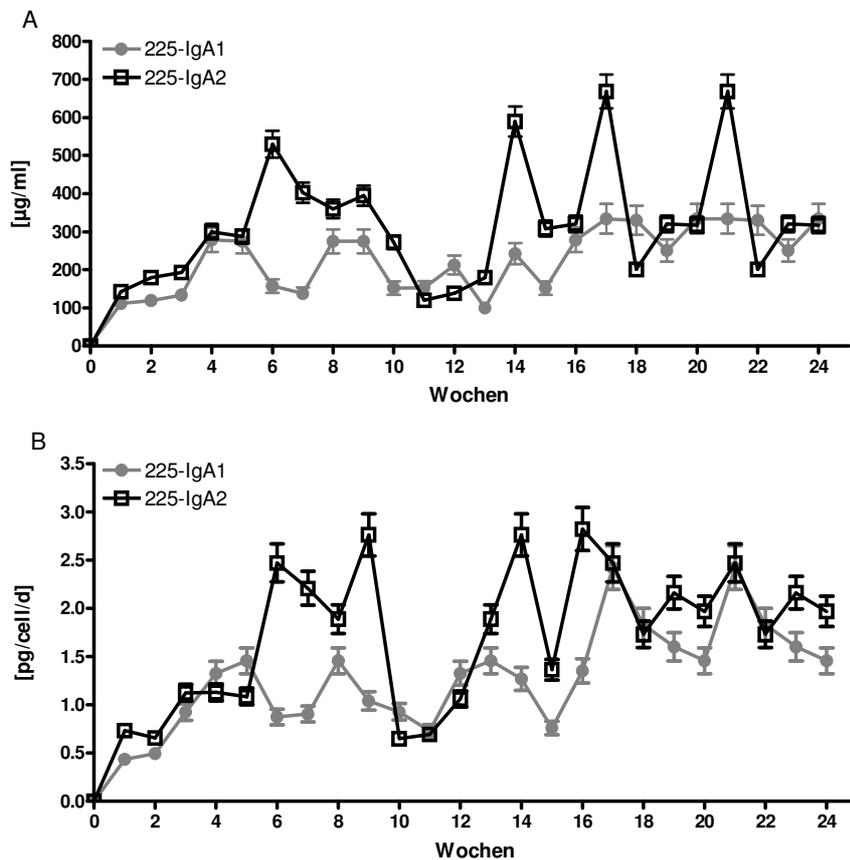


Abbildung 20: Kultivierung der Transfektanten für 225-IgA1 und 225-IgA2 im CL1000 Produktionssystem. Nach der Inokulierung der Zellen in den Bioreaktor begann eine Adaptionsphase. Nach einem Zeitraum von 4 bis 6 Wochen war sowohl die Konzentration des Antikörpers (A) als auch die spezifische Produktionsrate [pg/Zelle/d] (B) angestiegen. Es war nicht nachweisbar, dass 225-IgA2 von den CHO-Zellen stärker produziert und sezerniert wurde als 225-IgA1. Danach blieben die Parameter innerhalb eines gewissen Schwankungsbereichs über die folgenden Wochen und Monate stabil.

Charakterisierung rekombinanter IgA-Antikörper gegen den EGFR - Ergebnisse -

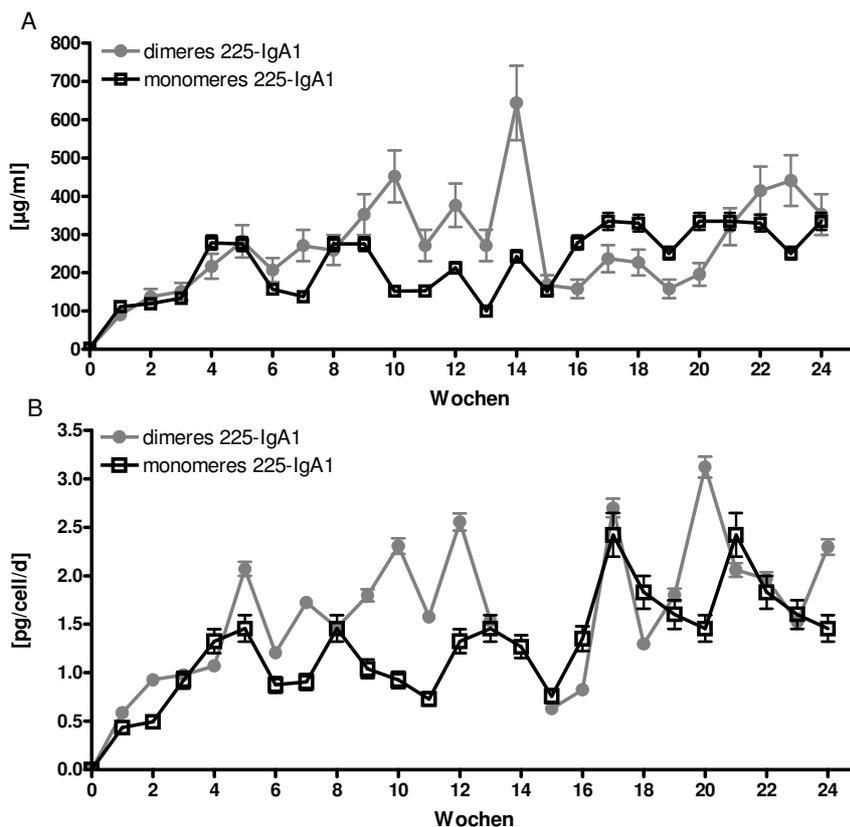


Abbildung 21: Kultivierung der Transfektanten für monomeres und dimeres 225-IgA1 im CL1000 Produktionssystem. Nachdem die Zellen in den Bioreaktor inokuliert wurden stiegen innerhalb der folgenden 4 bis 6 Wochen sowohl die Konzentration des Antikörpers (A) als auch die spezifische Produktionsrate [pg/Zelle/d] (B). Zwischen der Einfachtransfektante (225-IgA1), welche monomeres 225-IgA1 lieferte, und der Doppeltransfektante (225-IgA1+J), welche dimeres 225-IgA1 lieferte, schien es dabei keinen merklichen Unterschied zugeben. Danach blieben die Parameter innerhalb eines gewissen Schwankungsbereichs über die folgenden Wochen und Monate stabil.

3.1.3. Aufreinigung der einzelnen IgA Konstrukte

Bisherige Aufreinigungsstrategien für IgA-Antikörper lieferten keine zufrieden stellenden Ergebnisse bezüglich der Reinheit und waren darüber hinaus verlustreich. Andere für IgG erfolgreich etablierte Strategien waren für IgA-Antikörper nicht anwendbar. Aus diesen Gründen wurde für die Aufreinigung der EGFR-gerichteten IgA-Antikörper die folgende Strategie etabliert. Im ersten Schritt erfolgte für die Aufreinigung von monomeren und dimeren IgA-Antikörper eine Affinitätschromatographie. Mit einer ahukappa-Matrix konnten die IgA-Antikörper spezifisch aus dem Überstand aufgereinigt werden.

Im nächsten Schritt erfolgte für die Präparation von monomeren IgA eine Größenausschlusschromatographie, um dieses von polymerem IgA, Aggregaten und

nicht vollständig assoziierten Antikörpermolekülen zu trennen. In Vorversuchen wurden hierfür die Elutionsvolumen bestimmt, bei welchen dimeres und monomeres IgA eluieren. Zunächst wurde hierfür die Gelfiltration kalibriert mittels eines Kalibrierungskits. Dabei wurden mehrere Proteine mit bekannter Größe gleichzeitig aufgetragen (Abb. 22 A).

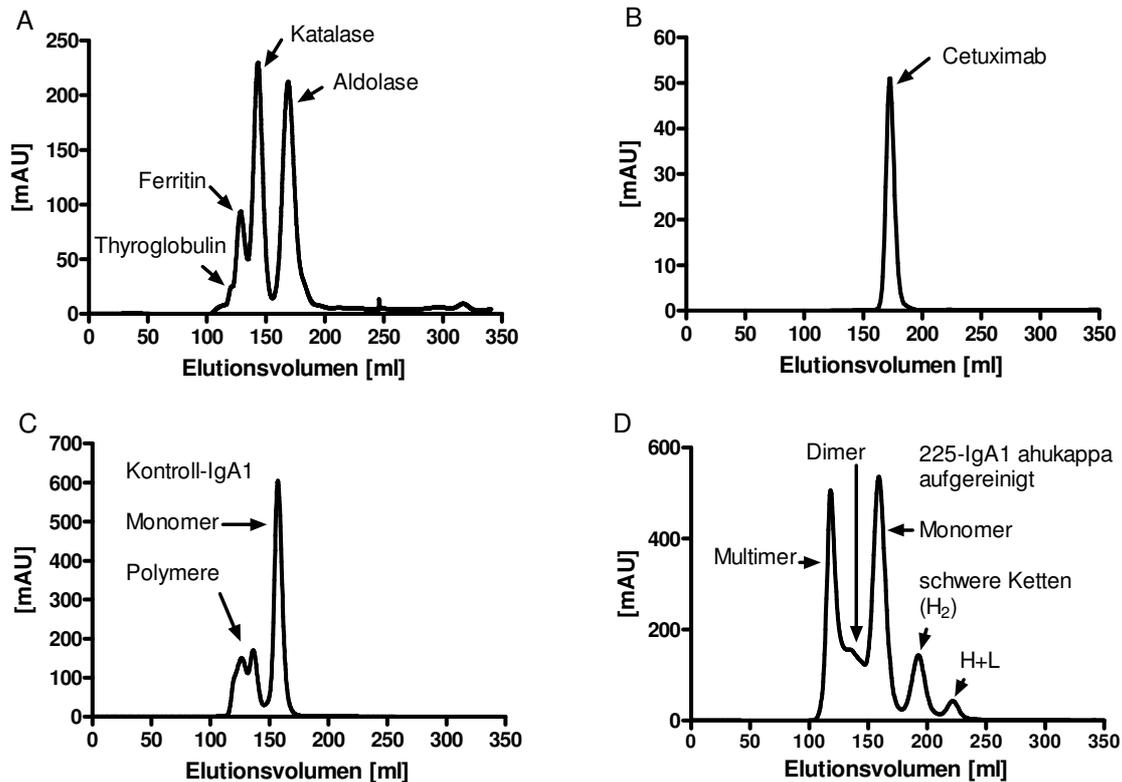


Abbildung 22: Kalibrierung der Größenausschlusschromatographie unter Verwendung von Superdex200 26x60 Säulen. (A) Kalibrierung der Säule mit Referenzproteinen. Vier Proteine mit unterschiedlichen molekularem Gewicht wurden dabei gleichzeitig auf die Säule aufgetragen: Aldolase (158 kDa), Katalase (240 kDa), Ferritin (450 kDa), Thyroglobulin (669 kDa). **(B)** Bei der größenausschlusschromatographische Auftrennung des 225-IgG1 konnte gezeigt werden, dass dieser bei 160 ml eluierte. **(C)** Ebenfalls wurde der Kontroll-IgA1-Antikörper über die Superdex200 Säule aufgetrennt. Offensichtlich befinden sich in der Präparation des gekauften IgA1-Antikörpers dimere und höher polymere Spezies des IgA1. **(D)** Im Vergleich dazu auf der rechten Seite die größenausschlusschromatographische Auftrennung von ahukappa aufgereinigtem 225-IgA1. Aufgrund der Standardkurve links würde monomeres 225-IgA1 mit einem molekularem Gewicht von 160 kDa ca. bei einem Elutionsvolumen von ca. 150 ml eluieren, dimeres 225-IgA1 mit ca. 320 kDa bei ca. 138 kDa und polymeres 225-IgA1 eluiert bei 110 ml. Beide Kurven zeigen, dass ab einem molekularen Gewicht von über 400 kDa die Auftrennung von Proteinen schwierig bis unmöglich wird. Proteine ab einem molekularen Gewicht von über 500 kDa eluieren gleichermaßen bei 110 ml. H₂ entsprechen Homodimeren aus zwei schweren Ketten, H+L sind Heterodimere aus leichten und schweren Ketten.

Bei diesen Proteinen (jeweiliges molekulares Gewicht) handelte es sich um Aldolase (158 kDa), Katalase (240 kDa), Ferritin (450 kDa) und Thyroglobulin (669 kDa). Für Aldolase ergab dieser Vorversuch, dass ein Protein mit 158 kDa bei einem Elutionsvolumen von ca. 150 ml eluiert. Die Katalase mit 240 kDa eluierte früher bei 135 ml. Mit 450 kDa eluierte Ferritin früher als die Katalase, nämlich bei 120 ml. Die Auflösung der Proteine mit höheren molekularen Gewichten über 400 kDa war nicht mehr genau. Daher ist die Auftrennung von Ferritin und dem größeren Thyroglobulin sehr ungenau. Proteine ab einem molekularen Gewicht von über 400 kDa eluieren daher alle gleichermaßen bei einem Elutionsvolumen von 110 bis 120ml. In einem weiteren Vorversuch wurden Kontrollantikörper mittels Gelfiltration größenausschlusschromatographisch aufgetrennt: ein 225-IgG1 (Abb. 22 B) und ein vergleichbarer kommerziell erhältlicher Kontroll-IgA1 (Abb. 22 C). Bei beiden Kontrollantikörpern konnte gezeigt werden, dass die Monomere bei einem Elutionsvolumen von 150 ml eluieren. Auf der anderen Seite konnten bei dem Kontroll-IgA1 polymere IgA-Spezies nachgewiesen werden. Dabei eluierte dimeres IgA bei 128 ml und die höher polymeren Formate bei 110 – 128 ml. Nach diesen Vorversuchen konnte das Elutionsverhalten der rekombinant hergestellten IgA-Antikörper abgeschätzt werden (Abb. 22 D).

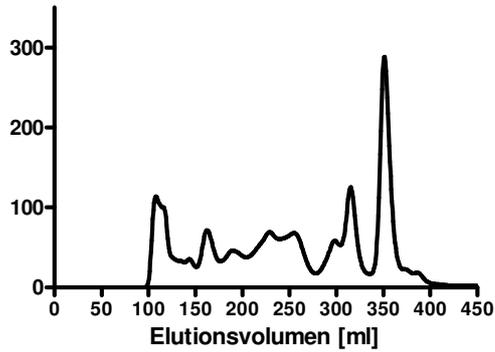
Aus diesem Grunde folgte nun die größenausschlusschromatographische Auftrennung der rekombinanten IgA-Konstrukte mittels der Superdex200 26x60 Säule (Abb. 23 A-D). Es wurden hierbei mehrere Absorptionshöhepunkte detektiert. Große Proteine wie Aggregate und polymerem 225-IgA eluieren bei 110 ml, dimeres IgA bei 128 ml und monomeres IgA bei 150 ml und darüber hinaus zwei Absorptionshöhepunkte bei 193 ml für H₂-Konstrukte (Homodimere aus schweren Ketten) und 225 ml für HL Formate (Heterodimere aus schweren und leichten Ketten). Monomeres 225-IgA wurde isoliert in dem Fraktionen bei einem Elutionsvolumen von 148-180 ml bei der präparativen Größenausschlusschromatographie vereinigt wurden. Bei der Aufreinigung von dimerem 225-IgA1 erfolgte vor der Größenausschlusschromatographie noch eine weitere Affinitätschromatographie. Hierbei konnten IgA-Antikörper mit inkorporierter J-Kette, die über die C-Terminale Penta-Histidin-Markierung der J-Kette im Rahmen einer immobilisierten Metallionen Affinitätschromatographie (IMAC) an die chelatierten Nickelionen der Matrix binden, isoliert werden. In einem dritten Schritt konnte dann dimeres 225-IgA1 von höhermolekularem IgA getrennt werden, in dem bei dieser

Gelfiltration Fraktionen bei Elutionsvolumen von 128-148 ml vereinigt wurden. Die aufgereinigten Monomere wurden vier Monate nach der Aufreinigung auf Superdex200 Säulen aufgetragen um die Proteinverteilung zu analysieren (Abb. 23 G, H). Das Absorptionsmaximum lag in beiden Fällen bei ca. 175 ml. Selbst nach 4 Monaten Lagerung bei 4°C in 1xPBS waren keine Veränderungen bezüglich Degeneration und Proteinverteilung festzustellen.

Für die Abbildungen 23 und 24 wurden die Eluate der einzelnen Aufreinigungsschritte auf einer analytischen Gelfiltrationssäule aufgetrennt, um den Verlauf und den Erfolg der einzelnen Schritte graphisch darstellen zu können. Für Abbildung 24 wurden die einzelnen Fraktionen gelelektrophoretisch aufgetrennt, mittels Elektrotransfer auf PVDF-Membranen transferiert. Unter Verwendung eines Peroxidase-gekoppelten Antikörpers gegen humane IgA-Antikörper konnte mittels Immundetektion die Proteinverteilung in den Fraktionen visualisiert werden. In Fraktion 1 des Eluats der ahukappa Aufreinigung konnten so monomere, dimere und polymere IgA-Spezies nachgewiesen werden (Abb.23 A und B). Fraktion 2 enthielt hauptsächlich monomeres IgA und Fraktion 3 bestand aus H₂ Formaten. Die IMAC (Abb. 24 C und D) brachte eine deutliche Steigerung der Reinheit. Hier waren in Fraktion 1 monomeres IgA und hohe Mengen dimeres und polymeres IgA nachweisbar. Fraktion 2 enthielt dimeres 225-IgA1. Das final aufgereinigte monomere und dimere 225-IgA1 wurden 4 Monate nach der Aufreinigung auf einer analytischen Gelfiltrationssäule analysiert (Abb. 24 E1 und E2). Das Absorptionsmaximum für dimeres 225-IgA1 lag bei 135 ml, für monomeres 225-IgA1 lag dieses bei ca. 175 ml. Auch im Falle des dimeren 225-IgA1 konnten nach 4 Monaten Lagerung bei 4°C in 1xPBS keine Veränderungen bezüglich der Proteinverteilung festgestellt werden. Als Ergebnis war in den Präparationen hochreines monomeres bzw. dimeres IgA nachzuweisen (Abb. 24 F).

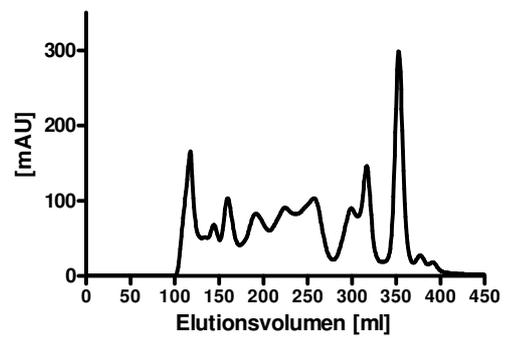
225- IgA1

A aufkonzentrierter Überstand

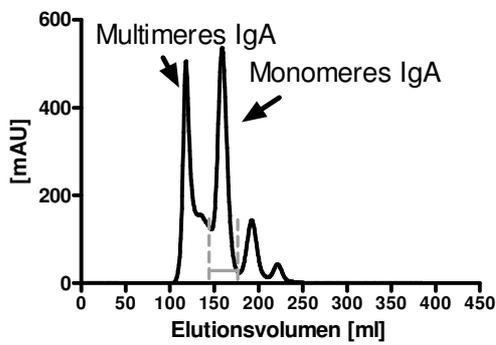


225- IgA2

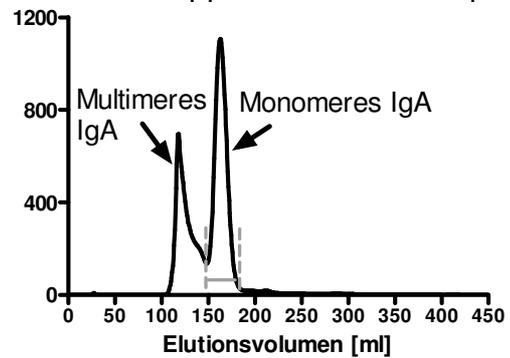
B aufkonzentrierter Überstand



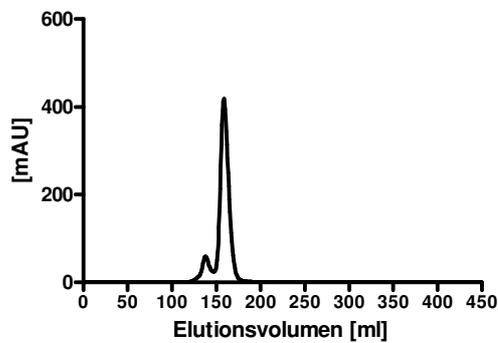
C anti-kappa eluierter Antikörper



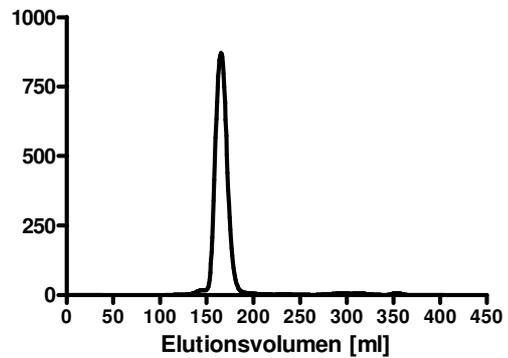
D anti-kappa eluierter Antikörper



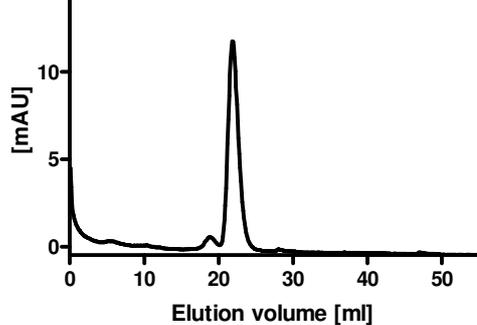
E aufgereinigtes Monomer



F aufgereinigtes Monomer



G aufgereinigtes Monomer
nach 4 Monaten



H aufgereinigtes Monomer
nach 4 Monaten

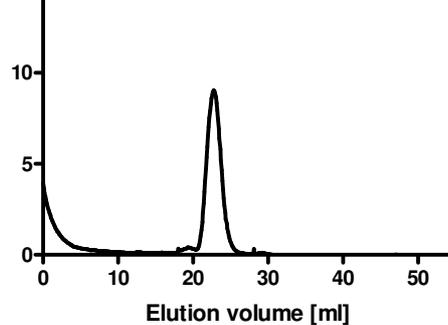


Abbildung 23: Ergebnisse der gröbenausschlusschromatographischen Analyse der Eluate der einzelnen Aufreinigungsschritte zur Gewinnung von monomerem 225-IgA. Die linke Reihe zeigt die Elutionsprofile für 225-IgA1, die rechte Reihe die Elutionsprofile für 225-IgA2. Die Graphen A und B zeigen zehnfach aufkonzentrierten Überstand von 225-IgA1- bzw. -IgA2-produzierenden CHO-K1 Zellen. C und D zeigen 225-IgA1- und 225-IgA2-Antikörper die über anti-human kappa spezifische Affinitätschromatographie aufgereinigt wurden. Für beide Isotypen konnten zwei Hauptfluoreszenzsignale detektiert werden jeweils für multimeres und monomeres IgA bei 118 bzw. 158 ml für 225-IgA1, und 119 bzw. 164 ml für 225-IgA2. Für 225-IgA1 sind bei 193 bzw. 225 ml zwei weitere kleinere Signale zu sehen. Die Signale bei 158 bzw. 164 ml repräsentieren Proteine der molekularen Größe von 150 kDa (monomeres IgA), 135 ml entsprechen ca. 320 kDa (dimeres IgA) und 118ml entsprechen multimerem IgA. Das aufgereinigte monomere 225-IgA wurde im Anschluss auf analytischen Gröbenausschlusschromatographiesäulen aufgetrennt, um die Proteinverteilung zu analysieren. Elutionsvolumen von 148-180 ml bzw. 148-184 ml entsprechen monomerem 225-IgA1 bzw. 225-IgA2. Ein kleiner Anteil von dimerem 225-IgA1 konnte bei einem Elutionsvolumen von 130 ml detektiert werden. An dieser Proteinverteilung verändert sich nichts nach 4 Monaten Lagerung der Monomere bei 4 °C in PBS (G und H).

Um zu zeigen, dass die Eluate aus monomerem und dimerem IgA bestanden, wurden die Fraktionen der anti-human-kappa- und IMAC-Aufreinigung nach der gröbenausschlusschromatographischen Aufreinigung über die Superdex200 Säule mittels Gelelektrophorese, Elektrotransfer und Immundetektion analysiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten, dass die Sequenz aus anti-human-kappa- und Superdex200-Aufreinigung ausreichend ist, um monomeres 225-IgA1 aufzureinigen. Im Falle des dimeren 225-IgA1 konnte gezeigt werden, dass nur die zweite Affinitätschromatographie mittels IMAC zu einer deutlichen Anreicherung von dimerem 225-IgA1 in der Präparation geführt hatte. In der folgenden Abbildung 24 sind die Ergebnisse zusammengestellt.

Charakterisierung rekombinanter IgA-Antikörper gegen den EGFR - Ergebnisse -

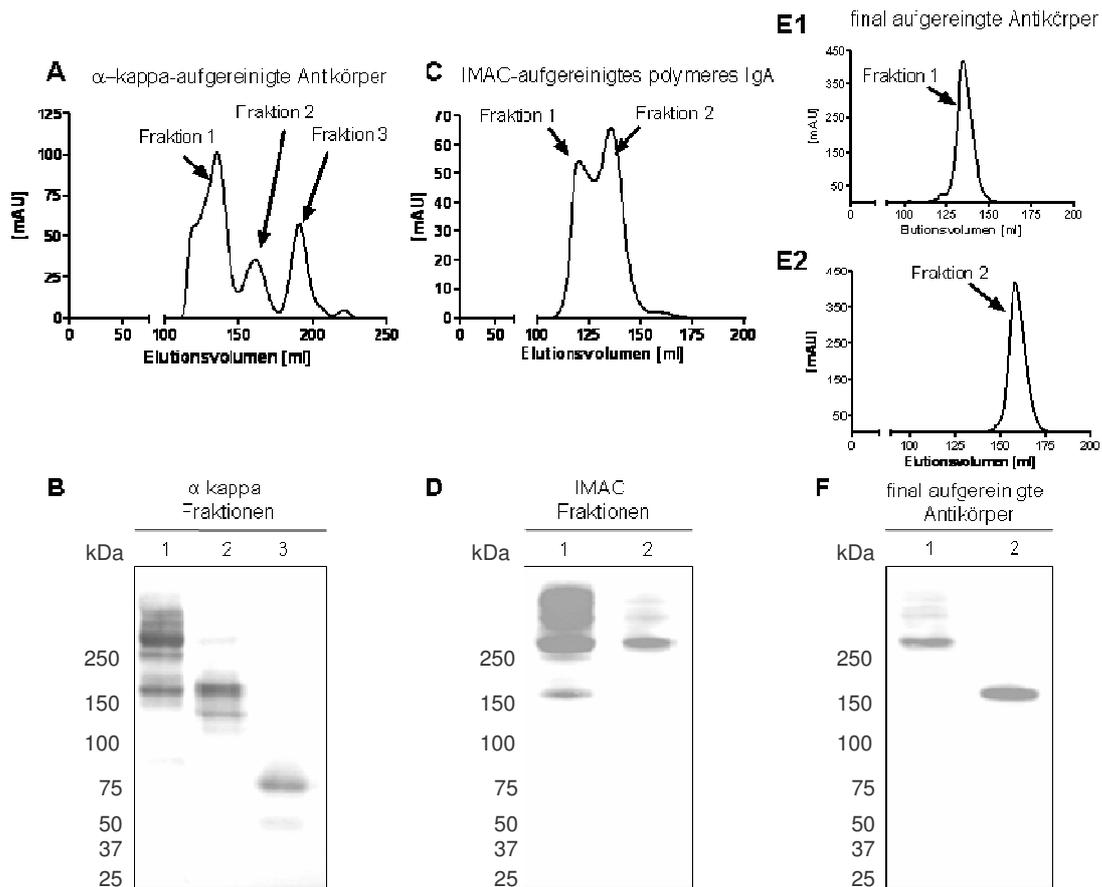


Abbildung 24: Aufreinigung von dimerem 225-IgA1 mit inkorporierter J-Kette. (A) Der Antikörper wurde aus Überständen der Doppeltransfektante für 225-IgA1 und J-Kette mittels Affinitätschromatographie über eine XK16-Säule beladen mit einer anti-human-kappa gerichteten Matrix aufgereinigt. Das Eluat wurde mittels Gelfiltration auf der Superdex200 Säule analysiert. (B) Die in A angezeigten Fraktionen 1-3 wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf PVDF-Membranen transferiert und Proben mittels eines Peroxidase markierten anti-human-alpha Antikörpers detektiert. In (C) gezeigt ist polymeres 225-IgA1 mit inkorporierter J-Kette, welches über den C-Terminale Penta-Histidin-Markierung der J-Kette mittels IMAC aufgereinigt und anschließende mittels Gelfiltration analysiert worden. (D) Die Analyse der Fraktionen mittels Immundetektion ergab, dass die Fraktion 1 monomeres 225-IgA und einen hohen Anteil an dimerem und höherpolymerem 225-IgA Formaten enthielt. Fraktion 2 bestand dagegen hauptsächlich aus dimerem 225-IgA1 mit einem molekularen Gewicht von ca. 320 kDa. Diese Fraktion wurde erneut mittels Gelfiltration untersucht. Das Ergebnis war ein homogenes Absorptionsmaximum bei 135 ml (E1). In (E2) wurde zum Vergleich monomeres 225-IgA1 mittels Gelfiltration analysiert. (F) Final aufgereinigtes monomeres und dimeres 225-IgA1 zeigten im Rahmen einer Analyse mittels Immundetektion dem molekularen Gewicht entsprechende Banden.

3.1.4. Quantifizierung der produzierten Antikörper

Die rekombinant hergestellten und mittels der oben beschriebenen Aufreinigungsstrategien generierten 225-IgA1 und 225-IgA2 Monomere sowie das

225-IgA1 Dimer wurden mit drei verschiedenen Methoden quantifiziert: UV_{280nm} Bestimmung, ein BCA Proteinnachweis und die Experion Kapillargelelektrophorese-Technik (Tab. 7). Insgesamt war es möglich, etwa 42,7 mg monomeren 225-IgA1 und 47,8 mg monomeren 225-IgA2 sowie 12,5 mg dimeren 225-IgA1 aus je 500 ml Überstand aufzureinigen.

Tabelle 7: Durchschnittliche Gesamtmenge der einzelnen IgA-Konstrukte ermittelt und berechnet mittels drei verschiedener Methoden.

Antikörper	Antikörper Gesamtmenge [mg]			
	UV280nm	BCA	Experion	Mittelwert
monomeres 225-IgA1	38,5 ± 3,2	43,4 ± 5,4	47,4 ± 6,1	43,1 ± 4,9
monomeres 225-IgA2	47,8 ± 5,8	55,4 ± 8,2	36,6 ± 4,6	46,6 ± 6,2
dimeres 225-IgA1	8,9 ± 1,2	9,7 ± 2,2	15,0 ± 5,4	11,2 ± 2,9

3.1.5. Bestimmung der Reinheit der Antikörper

Zusätzlich zur Konzentrationsbestimmung eignet sich die Experion Technologie für die Bestimmung der Reinheit. Nach mehreren unabhängigen Experimenten konnte für alle drei Konstrukte eine relativ hohe Reinheit von $97,5 \pm 0,5$ % ermittelt werden. Die Ergebnisse dieser automatisierten Kapillargelelektrophorese-Technik waren Elektropherogramme, welche dann zu virtuellen Gelen umgerechnet wurden (Abb. 25 und 26). Die Areale unter den Elektropherogrammen wurden dabei kalkuliert für die Bestimmung der Proteinkonzentration und Reinheit in Relation zu internen System-Referenz-Markern und im Vergleich zu 225-IgG1 als Kontrollantikörper. In diesem System präsentierte ein Absorptionsmaximum bei 25 kDa die leichten Ketten und die J-Kette und ein Absorptionsmaximum bei 70 kDa die schweren Ketten (Abb. 26). Im direkten Vergleich mit 225-IgG1 zeigten die Elektropherogramme der IgA-Antikörper leichte Unterschiede bezüglich der Absorptionsmaxima für die schweren Ketten. Bei 225-IgA1-Monomeren war ein Hauptabsorptionsmaximum und ein kleineres benachbartes Absorptionsmaximum in einem Bereich von 70-100 kDa zusehen, welche allerdings im Falle des dimerem 225-IgA1 zu gleich hohen Absorptionshöhepunkten wurden. Im Falle des 225-IgA2-Monomers waren drei Absorptionshöhepunkte im Bereich von 75-120 kDa für die schweren Ketten nachweisbar. Die unterschiedlichen Höhepunkte repräsentieren vermutlich unterschiedliche Glykosylierungsformen, welche beim IgA2-Monomer stärker gewichtig sind, da IgA2 zweimal so viele N-Glykane besitzt als IgA1, und IgA1

wiederum zweimal mehr als IgG1. Das 225-IgA1-Dimer besteht augenscheinlich zu gleichen Teilen aus den beiden Glykosylierungsformen des 225-IgA1-Monomers (Abb. 26).

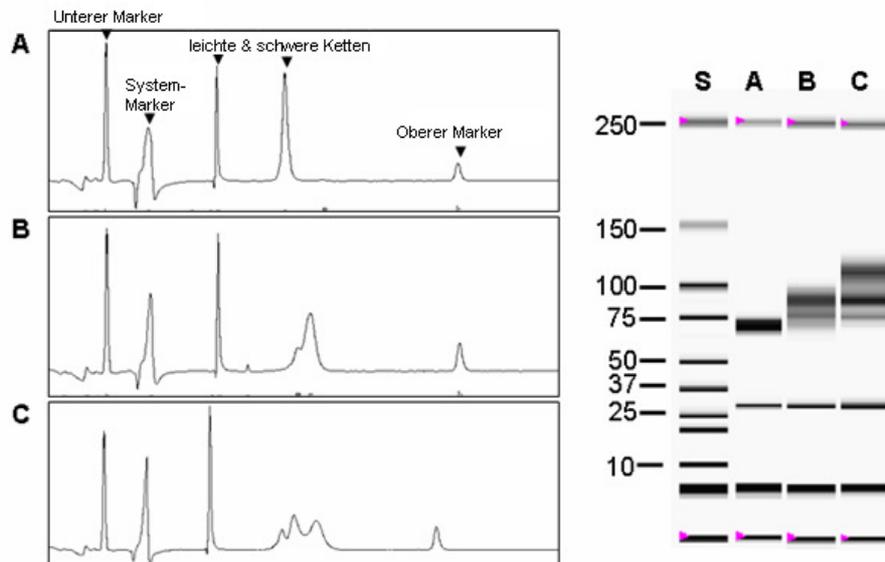


Abbildung 25: Ergebnisse der Kapillargelelektrophorese für 225-IgA Monomere. Gezeigt sind Elektropherogramme (linke Seite) für 225-IgG1 (A), aufgereinigten 225-IgA1 (B) und 225-IgA2 (C) unter reduzierten Bedingungen. Erstes und letztes Absorbptionsmaximum auf den Elektropherogrammen präsentierten den unteren und oberen Marker, welche im Probenpuffer enthalten und ebenso wie das System-Absorbptionsmaximum als Fixpunkte und zur Proteinquantifizierung dienen. Die Ergebnisse der Elektropherogramme werden transformiert zu einem virtuellen Gel (rechte Seite). Der molekulare Marker war zu sehen in Spur S, 225-IgG1 in Spur A, rekombinantes 225-IgA1 und 225-IgA2 in den Spuren B und C.

Charakterisierung rekombinanter IgA-Antikörper gegen den EGFR
- Ergebnisse -

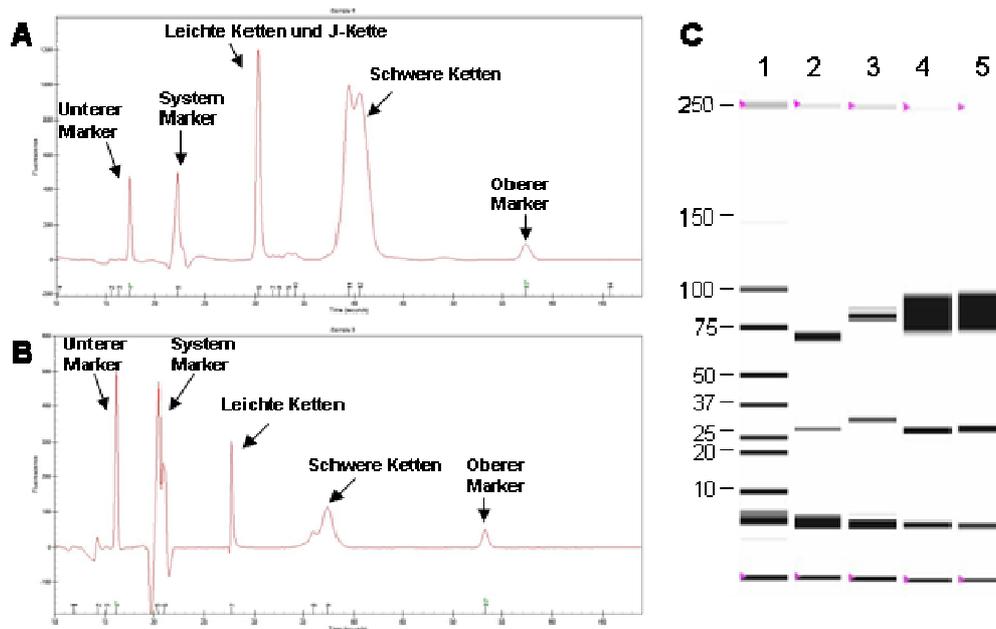


Abbildung 26: Ergebnisse der Experion-Analysen für dimeres 225-IgA1 im Vergleich zu monomerem 225-IgA1. Gezeigt sind Elektropherogramme von dimerem 225-IgA1 (A) und monomerem 225-IgA1 (B) auf der linken Seite. Die Proteine wurden unter reduzierenden Bedingungen durch die Kapillargelelektrophorese aufgetrennt und markiert mit einem Fluoreszenzfarbstoff und Absorptionshöhepunkte wurden durch Laser-induzierte Fluoreszenz detektiert. Absorptionshöhepunkte für leichte und schwere Ketten bzw. für die J-Kette befinden sich zwischen den Absorptionshöhepunkten für Marker und den System-Markern. Die Elektropherogramme wurden transformiert zu einem virtuellen Gel (rechte Seite). In den einzelnen Spuren zu sehen sind der molekulare Marker (1), 225-IgG1 (2) und Kontroll-IgA1 (3), monomeres 225-IgA1 (4) und dimeres 225-IgA1 mit J-Kette (5).

Die Bestimmung der Reinheit erfolgte außerdem mittels gelelektrophoretischer Auftrennung der Antikörper unter nativen Bedingungen (Abb. 27). Beide Monomere sowie das 225-IgA1-Dimer lieferten im Vergleich zu kommerziell erwerbbarer Kontrollantikörper wie 225-IgG1 und Kontroll-IgA1 bzw. -IgA2 sowie Colostrum (SIgA) nur Banden in der zu erwartenden Höhe. Damit konnte die hohe Reinheit, welche die mit den Gelfiltrationsexperimenten bereits gezeigt werden konnte, ein weiteres Mal bestätigt werden.

Charakterisierung rekombinanter IgA-Antikörper gegen den EGFR
- Ergebnisse -

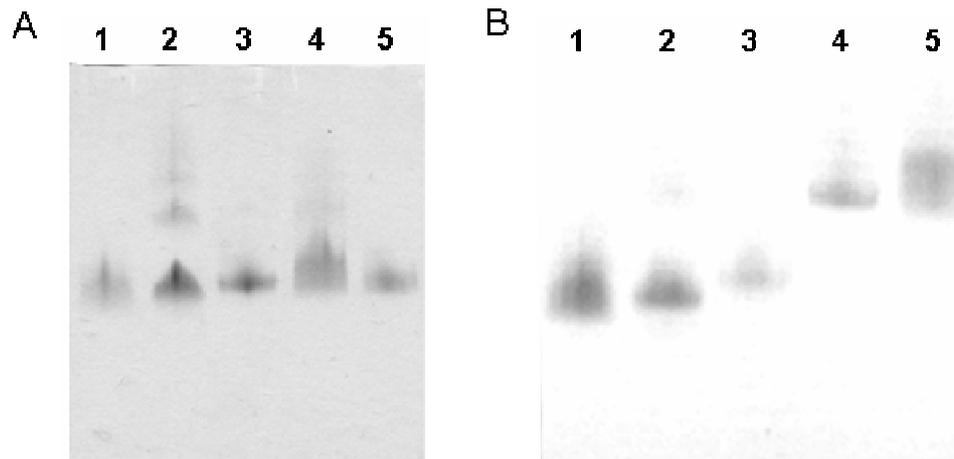


Abbildung 27: Auftrennung von rekombinant hergestellten und gekauften Antikörper auf nativen Polyacrylamidgelen. (A) Bei dieser Methode wurden aufgereinigtes monomeres 225-IgA1 (Spur 3), 225-IgA2 (Spur 5) sowie die Referenzproteine 225-IgG1 (Spur 1), Kontroll-IgA1 (Spur 2), Kontroll-IgA2 (Spur 4) unter nativen Bedingungen auf 4-16% Bis-Tris-Gelen aufgetragen und mit Coomassie gefärbt. Beide Monomere lieferten eine Bande auf der jeweils erwarteten Höhe. (B) Auf dem rechten Gel wurden das aufgereinigte monomere 225-IgA1 (Spur 3), das 225-IgA1-Dimer (Spur 4) sowie die Referenzproteine 225-IgG1 (Spur 1), Kontroll-IgA1 (Spur 2) und sekretorischem IgA1 (Spur 5) unter nativen Bedingungen auf 4-16 % Bis-Tris-Gelen aufgetragen und zugleich mit Coomassie gefärbt. Das Monomere sowie das Dimer lieferten eine Bande auf der jeweils erwarteten Höhe.

Neben den nativen Gelen stellte die Silberfärbung von auf 3-8% Tris-Acetat-Gelen gelelektrophoretisch aufgetrennten Antikörpern unter denaturierenden Bedingungen eine weitere Möglichkeit der Überprüfung der Reinheit dar. Für alle Konstrukte konnte gezeigt werden, dass auch bei einer sehr empfindlichen Methode wie der Silberfärbung keine Kontaminanten in den Präparationen zu finden waren (Abb. 28). Das aufgereinigte 225-IgA1 Monomer zeigte unter nichtreduzierenden Bedingungen (Abb. 28 A und B) eine zu erwartende Hauptbande bei ca. 160 kDa für monomeres IgA1, auf B sind weitere Banden für dimeres IgA1 bei ca. 320 kDa, für Heterodimere aus leichten und schweren Ketten bei 75 kDa und für schwere Ketten bei 50 kDa zu sehen. Unter reduzierenden Bedingungen waren zwei Banden für schwere (60 kDa) und leichte (25 kDa) Ketten (Abb. 28 C) nachzuweisen. Das monomere 225-IgA2 zeigte unter nichtreduzierenden Bedingungen Banden bei ca. 150 kDa für monomeres IgA2 und 100 kDa für Homodimere aus schweren Ketten und bei ca. 40 kDa für Leichtkettendimere (Abb. 28 A). Die heterogenen N-Glykane bewirkten hier keine klare Bandenabgrenzung. Dies war auch unter reduzierenden Bedingungen zu sehen (Abb. 28 C). Die schweren Ketten zeigten Banden von 50- ca. 65 kDa.

Daneben war eine Bande bei 25 kDa für die leichten Ketten zu beobachten. Die schwachen Banden bei 100 kDa stammten von Homodimeren aus schweren Ketten. Das dimere 225-IgA1 zeigte unter nichtreduzierenden Bedingungen eine Hauptbande bei ca. 320 kDa für dimeres 225-IgA1, und einige sehr schwache Banden für höhere Polymere (Abb. 28 B), die anscheinend nicht vollständig separiert werden konnten. Unter reduzierenden Bedingungen waren für dimeres wie monomeres 225-IgA1 zwei Banden für schwere Ketten bei 60 kDa und für leichte Ketten bei 25 kDa (Abb. 28 D) zu sehen. Die Silbergele wiesen für alle drei Antikörper, 225-IgA1- und -IgA2-Monomere und das 225-IgA1-Dimer, sehr saubere Präparationen nach.

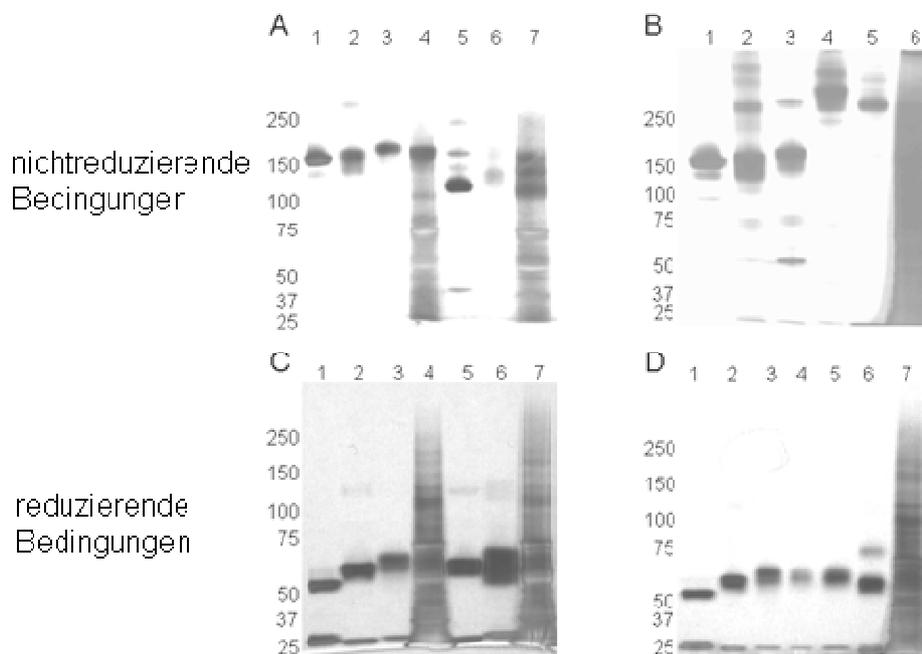


Abbildung 28: Gelelektrophoretische Auftrennung und anschließende Silberfärbung der präparierten EGFR-gerichteten IgA-Antikörper. Die Proteine wurden gelelektrophoretisch auf 3-8% Tris-Acetat-Gelen aufgetrennt und im Anschluss mit Silbernitrat gefärbt. Die oberen Gele (A und B) zeigen die Ergebnisse unter nichtreduzierenden Bedingungen, die unteren Gele (C und D) die Ergebnisse unter reduzierenden Bedingungen. Die Gele A und C zeigen den Vergleich der aufgereinigten 225-IgA1- (Spur 3) und 225-IgA2-Monomere (Spur 6) mit gekauften Kontroll-IgA1 (Spur 2) und -IgA2 (Spur 5) Antikörpern, dem 225-IgG1 (Spur 1) und dem entsprechenden CL1000 Überstand der Transfektanten für 225-IgA1 (Spur 4) und 225-IgA2 (Spur 7), aus denen die Antikörper aufgereinigt wurden. Die Gele B und D zeigen den Vergleich zwischen monomeren 225-IgA1 (Spur 3) und dimerem 225-IgA1 (Spur 5 in B, Spuren 4 und 5 in D) mit gekauften Kontrollantikörper für IgA1 (Spur 2) und sekretorischem IgA (Spur 4 in B, Spur 6 in D), dem 225-IgG1 (Spur 1) und dem Überstand der Doppeltransfektanten für 225-IgA1 und J-Kette (Spur 6 in B und 7 in D). Gezeigt sind Fotografien von drei verschiedenen Experimenten.

3.1.6. Nachweis der korrekten Zusammenlagerung

Darüber hinaus wurden die einzelnen präparierten Antikörpermoleküle mittels einer Reihe von Immunoblot-Analysen auf ihre korrekte Zusammensetzung hin untersucht. Dafür wurden zunächst optimale Bedingungen für diese Untersuchungen ermittelt. Aus diesem Grund wurden sechs verschiedene Konzentrationen des 225-IgA1 Monomers unter denaturierenden, nichtreduzierenden Bedingungen aufgetrennt und nach dem Transfer auf die PVDF-Membran mit einem polyklonalen Antikörper gegen die schwere Kette von IgA-Antikörpern detektiert. Mittels dieses Versuchsaufbaus war es möglich, optimale Auftragungsmengen und Entwicklungszeiten zu bestimmen (Abb. 29).

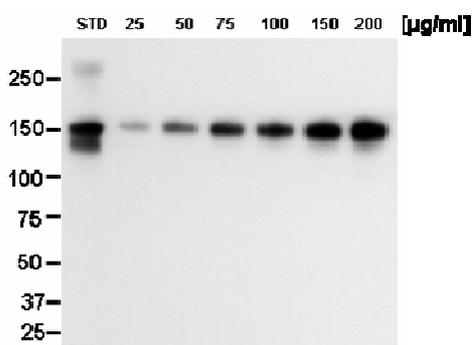


Abbildung 29: Immunoblot Analysen.

Monomeres 225-IgA1 wurden auf 3-8% Tris-Acetat-Gelen unter nichtreduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Es wurden verschiedenen Konzentrationen aufgetragen, um die Signalintensität zu testen.

Für die nun folgenden Western Blot Analysen wurden die Antikörper ebenfalls auf 3-8% Tris-Acetat-Gelen unter denaturierenden, nichtreduzierenden bzw. reduzierenden Bedingungen aufgetrennt im Anschluss auf PVDF-Membranen transferiert und auf diesen die humane α schwere, die humane κ leichte Kette und der Penta-Histidin-Markierung der J-Kette nachgewiesen. Die Abbildungen 30, 31 und 32 zeigen die Ergebnisse dieser Proteinnachweise.

Intaktes monomeres 225-IgA1 und 225-IgA2 lieferten unter nicht reduzierenden Bedingungen Banden bei ca. 160 kDa (indiziert mit H_2L_2). In der Präparation des monomeren 225-IgA1 waren weitere Banden bei 320 kDa für dimeres 225-IgA1 (H_4L_4) und bei 75 kDa für Heterodimere aus schweren und leichten Ketten (HL) zu sehen. Da der in dieser Arbeit klonierte IgA2-Allotyp m1 über keine kovalente Verknüpfung von leichten und schweren Ketten verfügt, waren auf den Western Blots die zu erwartenden Zerfallsprodukte zu sehen. Neben der Bande für monomeres 225-IgA2 bei ca. 160 kDa war daher ebenfalls eine Bande für Homodimere aus schweren Ketten (H_2) bei 110 kDa beim Nachweis der α Ketten und eine Bande bei 37 kDa für die Homodimere der leichten Ketten (L_2) beim Nachweis der κ -Ketten zu sehen.

Charakterisierung rekombinanter IgA-Antikörper gegen den EGFR
- Ergebnisse -

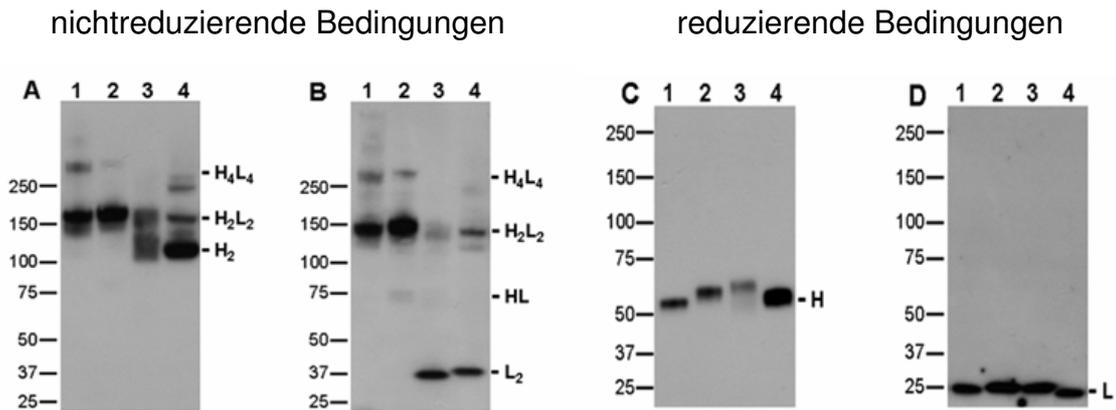


Abbildung 30: Immunoblot Analysen von monomerem 225-IgA1 und 225-IgA2. Aufgereinigte rekombinante und gekaufte monoklonale IgA-Antikörper wurden hier gegenübergestellt. Separiert wurden diese auf 3-8% Tris-Acetat-SDS-Gelen unter denaturierenden nichtreduzierenden (A, B) und reduzierenden Bedingungen (C, D). Nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran wurden die einzelnen Proteinbestandteile nachgewiesen unter Verwendung eines polyklonalen anti-human α schwere Ketten Antikörpers (A und C) und eines polyklonalen anti-human κ leichte Ketten Antikörper (B und D). Jeweils auf der linken Seite werden die molekularen Größen angezeigt. Kommerzielle Antikörper liefen in den Spuren 1 (Kontroll-IgA1) und 4 (Kontroll-IgA2), Präparationen der monomeren Antikörper in den Spuren 2 (225-IgA1) und 3 (225-IgA2). Unter nichtreduzierenden Bedingungen finden sich Banden für die vollständigen Monomere (H₂L₂, 160 kDa), schwache Banden für dimeres IgA (H₄L₄, 320 kDa), Homodimere von schweren und leichten Ketten und Heterodimere aus leichten und schweren Ketten für IgA2 (H₂, 110 kDa; L₂, 37 kDa; HL, 75 kDa). Unter reduzierenden Bedingungen zeigten beide Isotypen einzelne Banden für schwere Ketten (H, 60-65 kDa) und leichte Ketten (L, 25 kDa).

Bei der Charakterisierung des dimeren 225-IgA1 zeigten sich unter nicht reduzierenden Bedingungen Banden bei ca. 320 kDa für dimeres IgA bei allen drei Proteinnachweisen. Unter reduzierenden Bedingungen zeigten alle Konstrukte die typischen Banden bei 60-65 kDa für schwere Ketten (H), bei 25 kDa für die leichten Ketten (L) und für die J-Kette ebenfalls bei 25 kDa, da diese unter diesen Bedingungen auf der Höhe der leichten Ketten lief.

Charakterisierung rekombinanter IgA-Antikörper gegen den EGFR
- Ergebnisse -

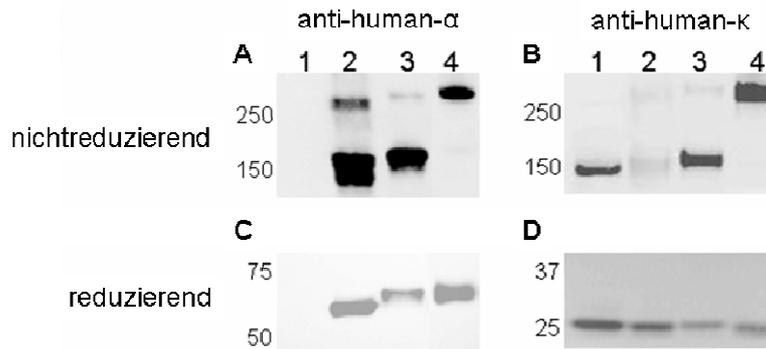


Abbildung 31: Immunoblot Analysen von dimerem 225-IgA1 im Vergleich mit monomerem 225-IgA1 und Referenzantikörpern. Aufgereinigtes monomeres und dimeres 225-IgA1 wurden auf SDS-Gelen unter nichtreduzierenden (A, B) und reduzierenden (C, D) auf 3-8% Tris-Acetat-Gelen. Nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran wurde diese mit einem polyklonalen Antikörper gegen die humane α schwere (A und C) und die kappa leichte Kette (B und D) gefärbt. Unter nichtreduzierenden Bedingungen zeigte dimeres 225-IgA1 (Spur 4) Banden auf der Höhe von 320 kDa während monomeres 225-IgA1 (Spur 3) Banden in der Höhe von 160 kDa und eine schwache Bande auf der Höhe von 320 kDa zeigte. Das molekulare Gewicht von 160 kDa entspricht monomerem IgA1, 320 kDa entsprechend dimerem IgA1. Unter reduzierenden Bedingungen zeigten alle Antikörper Einzelbanden für schwere Ketten (60 kDa) sowie für leichte Ketten und die J-Kette (25 kDa). Ein kommerziell erwerbbarer IgA1 (Spur 2) und 225-IgG1 (Spur 1) dienen als Kontrollantikörper.

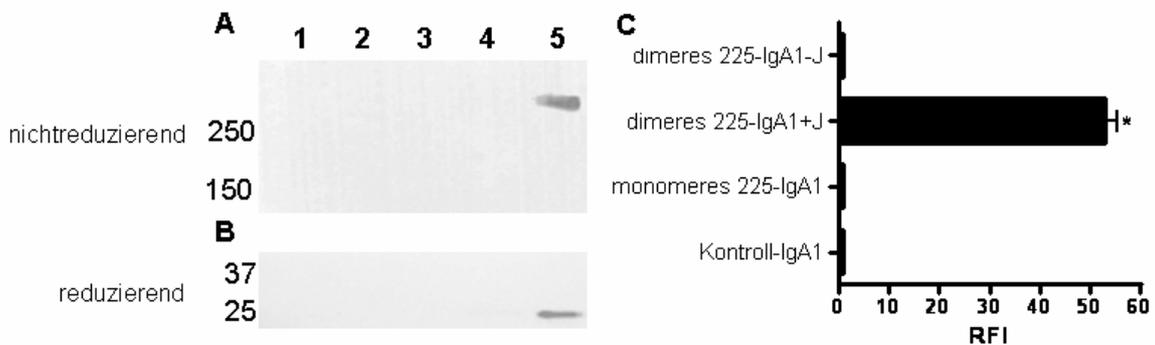


Abbildung 32: Nachweis der Inkorporation der J-Kette in das dimere 225-IgA1 mittels verschiedener Immundetektionen. (A und B) Nachweis der inkorporierten J-Kette mittels Immundetektion des C-terminal fusionierten Penta-Histidin-Markierungs nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Konstrukte auf 3-8% Tris-Acetat-Gelen unter nichtreduzierenden (A) und reduzierenden (B) Bedingungen und anschließendem Transfer auf eine PVDF-Membran. In den Spuren aufgetragen wurden 1) 225-IgG1, 2) Kontroll-IgA1, 3) monomeres 225-IgA1, 4) SIgA und 5) dimeres 225-IgA1. (C) Nachweis der inkorporierten J-Kette mittels indirekter Immunfluoreszenzen. Nur im über die Penta-Histidin-Markierung aufgereinigten dimeren 225-IgA1 konnte die Penta-Histidin-Markierung und damit die Inkorporation der J-Kette nachgewiesen werden. Gezeigt sind Mittelwerte mit Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten.

Es war zu beobachten, dass die schweren Ketten des 225-IgA1 leicht höher als die des Kontroll-IgA1 liefen, und die des 225-IgA2 wiederum höher als die des 225-IgA1. Diese Unterschiede könnten auf die unterschiedliche Glykosylierung zurückgeführt werden. Mit den Immunoblot Analysen konnte nachgewiesen werden, dass die aufgereinigte EGFR-gerichteten IgA-Antikörper korrekt aus schweren und leichten Ketten zusammgebaut waren, und dass im dimeren 225-IgA1 ebenfalls die J-Kette inkorporiert war. Die Inkorporation der J-Kette in das dimere 225-IgA1 konnte ebenfalls mit einer indirekten Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Hierfür wurden A431-Zellen mit dimerem 225-IgA1 mit und ohne inkorporierter J-Kette und monomerem 225-IgA1 inkubiert, und im Anschluss mittels eines Maus-anti-Penta-Histidin und eines Ziege-anti-Maus-IgG-FITC die Penta-Histidin-Markierung der J-Kette des dimeren 225-IgA1 mit inkorporierter J-Kette nachgewiesen (Abb. 32 C).

3.1.7. Charakterisierung der EGFR-gerichteten IgA-Antikörper mittels Immunfluoreszenzen

Als Zielzellen für den Nachweis der Bindung an den humanen CD89 dienten BHK-21-Zellen, welche mit dem humanen Fc α RI und der Fc γ -Kette transfiziert waren. Zum Nachweis, dass diese Transfektanten auch CD89 exprimieren wurde eine direkte Immunfluoreszenz angewendet (Abb. 33 A).

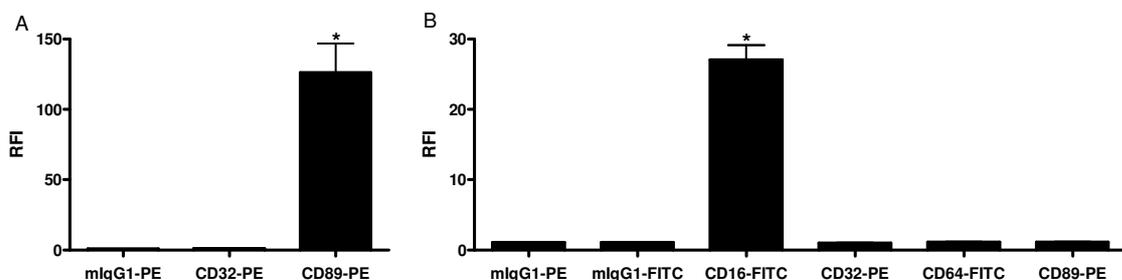


Abbildung 33: Nachweis der Fc-Rezeptor-Expression mittels direkter Immunfluoreszenz. (A) Mittels einer direkten Immunfluoreszenz konnte mit dem CD89-spezifischen Antikörper im Vergleich mit dem in diesem Fall irrelevanten Antikörper gegen CD32 die Expression vom Fc α RI auf den transfizierten BHK-21-Zellen nachgewiesen werden. (B) BHK-21-Zellen wurden ebenfalls mit CD16 transfiziert. Anschließend konnte der Erfolg der Transfektion mittels dieser direkten Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. Signifikanzen ($p \leq 0,05$) in Relation zur Isotypkontrolle sind mit einem Stern markiert.

Im direkten Vergleich mit zwei murinen IgG1-Antikörpern gegen den CD89 und den CD32 lieferte erwartungsgemäß nur der Fc α RI-spezifische Antikörper CD89 PE-

gekoppelte Antikörper ein Signal. Damit konnte sichergestellt werden, dass die BHK-21-Transfektanten den Fc α RI auch exprimieren. Des Weiteren wurden BHK-21 Zellen auch mit dem Fc γ RIIIa (CD16a) transfiziert, einem Fc-Rezeptor spezifisch für IgG-Antikörper. Als Nachweismethode für die Expression von der Rezeptorvariante CD16 diente eine direkte Immunfluoreszenz (Abb. 33 B). Hierbei konnte gezeigt werden, dass die BHK-Zellen nur den transfizierten Fc γ RIII (CD16) und keine weiteren Fc-Rezeptoren für IgG-Antikörper (CD32, CD64) exprimieren.

Dieses Zellmodell diente zum Nachweis, dass die rekombinant hergestellten IgA-Konstrukte nicht unspezifisch an die BHK-21-Zellen binden (Abb. 34 A), sondern spezifisch an ihren Fc-Rezeptor. Im direkten Vergleich konnte gezeigt werden, dass IgG1-Antikörper wie 225-IgG1, KLH oder Rituximab an den Fc γ RIII banden, jedoch nicht die EGFR-gerichteten IgA-Antikörper. Eine weitere Spezifitätskontrolle, die sich auf die Bindung an das Antigen bezog lieferte eine indirekte Immunfluoreszenz mit Raji-B-Lymphom-Zellen (Abb. 34 B). Diese Zielzellen exprimieren ein für die Behandlung von B-Lymphomen therapeutisch relevantes Antigen, CD20. Dadurch ergab sich eine Gelegenheit die Spezifität der EGFR-Antikörper in einem anderen Antigen-System zu testen. Es konnte gezeigt werden, dass nur Rituximab, der spezifische IgG1 gegen CD20, in der Lage war, an Raji-Zellen zu binden.

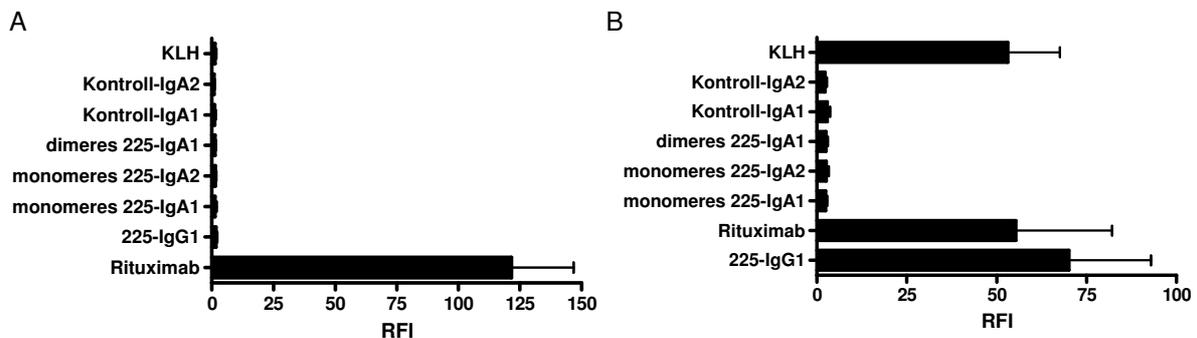


Abbildung 34: Indirekte Immunfluoreszenzen zum Nachweis der Antigen- und der Fc-Rezeptor-Spezifität. (A) Im Rahmen dieser ersten Spezifitätskontrolle konnte nachgewiesen werden, dass die hergestellten EGFR-gerichteten IgA-Antikörper nicht an CD20-exprimierende Raji-Zellen binden. (B) Die zweite Spezifitätskontrolle betraf die Fc-Spezifität. Die IgA-Antikörper banden somit nicht an CD16a positive BHK-21-Zellen im Gegensatz zu IgG1-Antikörpern. Gezeigt sind Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten.

Bevor Immunfluoreszenzen zur Untersuchung funktionaler Voraussetzungen der verschiedenen IgA-Antikörper unternommen werden konnten, musste der Isotyp

sowohl der Antikörper in den Überständen als auch der aufgereinigten Antikörper bestimmt werden. Der Nachweis erfolgte mittels einer indirekten Immunfluoreszenz auf A431-Tumorzellen als EGFR-exprimierenden Zielzellen. Detektiert wurden die Isotypen mit isotypspezifischen Sekundärantikörpern gegen die schweren Ketten von IgA1 und IgA2 (Abb. 35). Es konnte gezeigt werden, dass die Isotypen, welche transfiziert wurden, auch in den Überständen und den aufgereinigten Präparationen wieder zu finden waren.

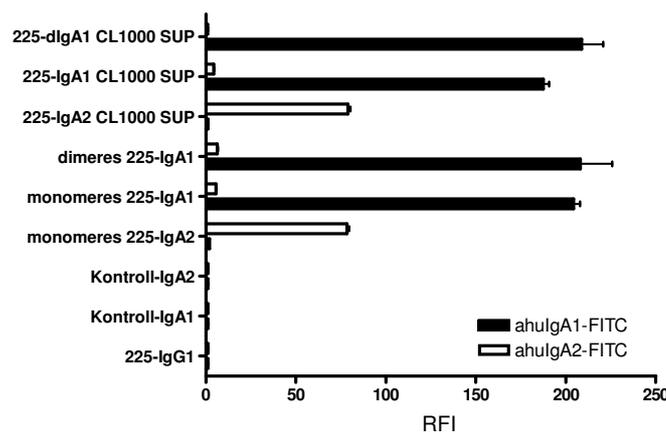


Abbildung 35: Indirekte Immunfluoreszenz zum Nachweis des Isotyps der IgA-Antikörper. (A) Mittels für IgA1- und IgA2- spezifischen Sekundärantikörpern konnte der Isotyp der IgA-Antikörper im Überstand und im finalen aufgereinigten Zustand nachgewiesen werden. Es konnte keine Verunreinigungen festgestellt werden. Gezeigt sind Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten.

Zwei wichtige Voraussetzungen für weitere funktionelle Untersuchungen sind die Nachweise, dass die in dieser Arbeit rekombinant hergestellten IgA-Antikörper sowohl an das Antigen, den EGFR, als auch an den IgA-Rezeptor der Effektorzellen, den Fc α RI, binden (Abb. 36). Die Affinitäten der einzelnen IgA-Antikörper im Vergleich zu einem vergleichbaren 225-IgG1 wurden mittels einer indirekten Immunfluoreszenz auf A431-Tumorzellen untersucht. Mit steigender Konzentration der Antikörper konnte nachgewiesen werden, dass alle Konstrukte ähnliche Bindungsaffinitäten besaßen. Beim Vergleich der monomeren IgA-Konstrukte mit dem 225-IgG1 ergaben sich folgende EC50-Werte: für 225-IgA1 15,9 μ g/ml, für 225-IgA2 12,2 μ g/ml und für 225-IgG1 8,9 μ g/ml. Wurde monomeres mit dimerem 225-IgA1 verglichen konnte für dimeres 225-IgA1 ein EC50-Wert von 18,25 μ g/ml und für monomeres IgA1 ein Wert von 27,51 μ g/ml berechnet werden. Die Diskrepanzen der EC50-Werte könnten durch das Alter der verwendeten A431-Zellen erklärt werden. Für den Vergleich der Monomere wurden A431-Zellen ab der 17. Passage, für die

Vergleich Monomer versus Dimer ab der dritten Passage verwendet. Im letzteren Fall waren monomeres und dimeres 225-IgA1 in ihren Affinitäten signifikant unterschiedlich zueinander (p-Wert: 0,0002). Damit banden IgA-Dimere mit einer höheren Affinität an EGFR als das vergleichbare IgA-Monomer (Abb. 36 A und C). Unter den IgA-Antikörpern hatte 225-IgA2 die niedrigste Affinität, und beide IgA-Monomere waren weniger affin als der 225-IgG1. Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied berechnet werden. Nachdem geklärt werden konnte, dass alle EGFR-gerichteten IgA-Antikörper an EGFR-exprimierende Tumorzellen banden, blieb zu klären, ob dies auch für Fc α RI-exprimierende BHK-21-Zellen galt. Auch dieser Sachverhalt wurde mittels einer indirekten Immunfluoreszenz untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass alle drei rekombinanten IgA-Antikörper im direkten Vergleich mit einem gekauften IgA-Antikörper sehr ähnliche Bindungseigenschaften aufzeigten (Abb. 36 B und D).

Interessanterweise zeigten die Kontrollantikörper in der Tendenz leicht stärkere Bindungsaffinitäten als die hergestellten Antikörper. Ein möglicher Grund hierfür könnte sein, dass die Präparationen der Kontrollantikörper nicht aus reinen Monomeren bestanden, sondern einen deutlich größeren Anteil an dimerem und polymerem IgA-Formen beinhalteten, als die in dieser Arbeit präparierten monomeren Antikörper. Polymeres IgA1 bindet effektiver an CD89 als monomeres IgA1 (Oortwijn 2007). Diese Hypothese konnte bestätigt werden. Das rekombinant hergestellte dimere 225-IgA1 band signifikant effektiver an den humanen Fc α RI als sein monomeres Pendant. Die dargestellten Unterschiede zwischen den einzelnen IgA-Antikörper sind nach einer statistischen Prüfung mittels students T-Test signifikant (225-IgA1-Dimer versus 225-IgA1-Monomer $p = 0,0002$, Kontroll-IgA1 versus 225-IgA1-Monomer $p = 0,0016$). Graphisch dargestellt wurden die Ergebnisse in Abbildung 36.

Charakterisierung rekombinanter IgA-Antikörper gegen den EGFR
- Ergebnisse -

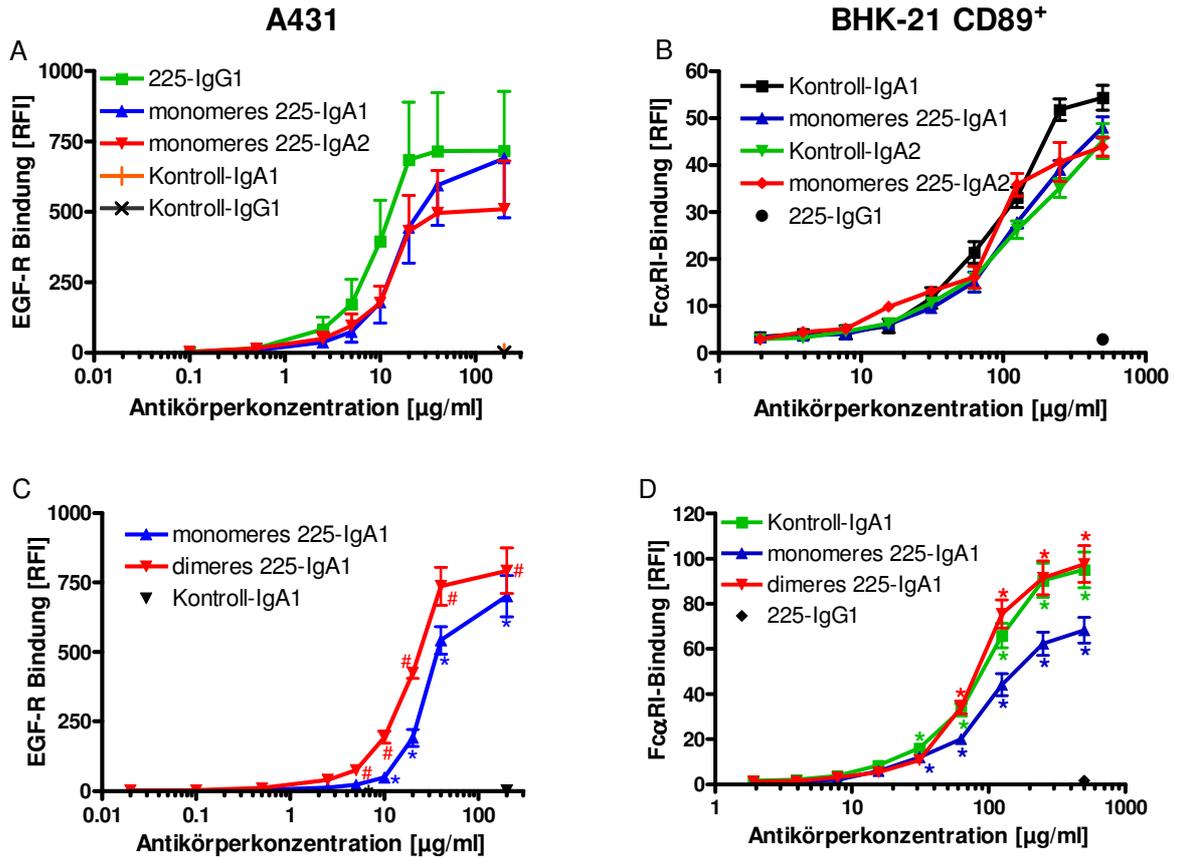


Abbildung 36: Indirekte Immunfluoreszenzen ergaben, dass die EGFR-gerichteten IgA-Antikörper an Antigen (EGFR) exprimierende A431 und an den IgA Fc-Rezeptor (FcαRI) exprimierende BHK-21-Zellen banden. Die Graphen A und C zeigen das Ergebnis der indirekten Immunfluoreszenzen mit A431-Tumorzellen als Zielzellen. Beide monomeren Formen zeigen ein ähnliches Bindungsverhalten. Dimeres 225-IgA1 dagegen band effektiver an A431-Zellen als monomeres 225-IgA1. Die beiden Graphen B und D auf der rechten Seite zeigen die Bindungskurven an CD89. Beide Monomere (B), 225-IgA1 und 225-IgA2, zeigen sehr ähnliche Charakteristika im Vergleich zu gekauften Kontroll-IgA-Antikörpern. Dimeres 225-IgA1 (D) band signifikant effektiver an CD89 und EGFR exprimierende Zellen als monomeres IgA1. Im Rahmen dieser indirekten Immunfluoreszenzen wurden ein FITC-konjugierter Sekundärantikörper gegen die humane kappa Kette verwendet. Sterne indizieren Signifikanzen ($p \leq 0,05$) in Relation zu einem irrelevanten Antikörper, im Falle von A und C der Kontroll-IgA1, in B und D 225-IgG1. Zu sehen sind Mittelwerte mit Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Um nachzuweisen, dass die beobachteten Unterschiede in den Dosiswirkungskurven zur Antigenbindung zwischen monomerem und dimerem 225-IgA1 nicht aufgrund des Sekundärantikörpers verursacht wurden, wurde der Versuch mit einem anderen α -Kette spezifischen Sekundärantikörper wiederholt. Auch unter diesen Versuchsbedingungen waren die gleichen Unterschiede zwischen monomerem und

dimerem 225-IgA1 festzustellen. Somit hat das Dimer des 225-IgA1 eine stärkere Affinität zum Antigen als das Monomer des 225-IgA1 (Abb. 37).

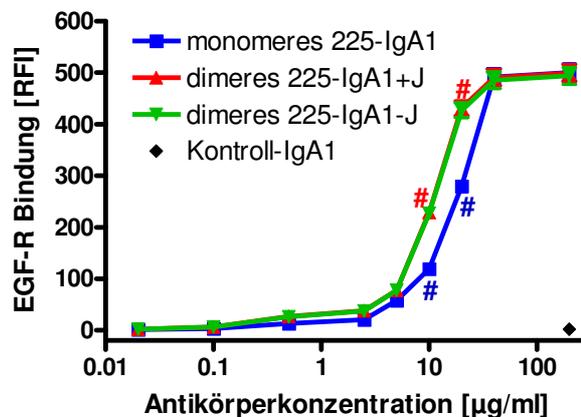


Abbildung 37: Dimeres 225-IgA1 bindet effektiver an EGFR-positive A431-Zellen als monomeres 225-IgA1. Unter Verwendung eines FITC-konjugierten polyklonalen anti-human α -leichte Kette gerichteten Sekundärantikörpers konnten signifikante Unterschiede in der Bindung an den EGFR-exprimierende A431-Zellen zwischen monomerem und dimerem 225-IgA1 festgestellt werden. Zu sehen sind Mittelwerte mit Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) zwischen monomerem und dimerem 225-IgA1 mit J-Kette sind mit Kreuzen gekennzeichnet.

3.1.8. Transzytose von dimerem 225-IgA1

Es ist eine Eigenschaft des dimeren IgA, schneller durch Basalmembranen zu diffundieren als andere Antikörper (Brandtzaeg 2009). Dimeres IgA ist neben pentamerem IgM das einzige Antikörperformat, dass in der Lage ist, an den pIgR zu binden und durch den Transportprozess der Transzytose auf die luminale Seite von Schleimhäuten transportiert zu werden (Brandtzaeg 1981). Das klassische Zellmodell zum Nachweis der Transzytose von dimerem IgA sind Mardin-Darby-Canine-Kidney-(MDCK)-Zellen, tubuläre Nierenzellen des Cocker Spaniel (Tamer 1995, Lewis 2005). Diese wurden mit einem Vektor transfiziert, welcher den humanen polymeren Immunglobulin Rezeptor kodiert. Die MDCK-Zellen mussten zweimal mit diesem Vektor transfiziert werden, um eine ausreichende Expressionshöhe zu garantieren. Im Anschluss wurden mittels Hygromycin-Selektionsdruck stabile Einzelklone generiert. Der Nachweis des pIgR auf der Zelloberfläche erfolgte mittels einer indirekten Immunfluoreszenz (Abb. 38 A). Bei diesem Versuch war darauf zu achten, beim Präparieren der Zellen auf Trypsin zu verzichten, da die extrazelluläre Domäne des pIgR eine Erkennungssequenz für dieses Enzym besitzt.

Nachdem das Zellmodell etabliert war, konnte mittels einer zweiten indirekten Immunfluoreszenz nun die Bindung der 225-IgA1-Antikörperkonstrukte an den plgR untersucht werden (Abb. 38 B). Das Ergebnis dieser Bindungsstudien war, dass nur dimeres IgA1 mit inkorporierter J-Kette an den plgR band, wogegen dimeres 225-IgA1 ohne J-Kette, monomeres 225-IgA1 sowie der Kontroll-IgA1-Antikörper auch bei hohen Konzentrationen keine Bindung an den plgR zeigten.

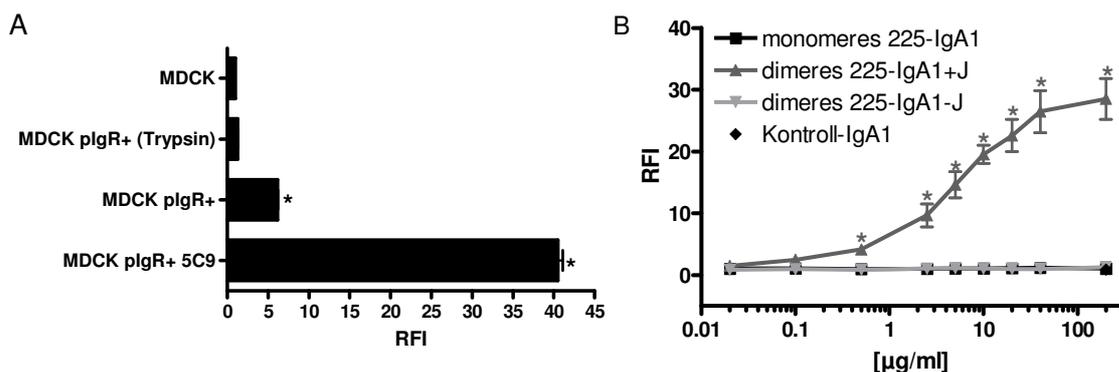


Abbildung 38: Nachweis der plgR-Expression und Bindung an plgR-transfizierte MDCK-Zellen.

(A) Mittels einer indirekten Immunfluoreszenz unter Verwendung eines Primärantikörpers gegen den plgR und eines FITC-markierten Sekundärantikörpers gegen murine Antikörper konnte die Expression des plgR auf den MDCK-Zellen nachgewiesen werden. Die einfach transfizierten MDCK plgR+ zeigten nur ein schwaches Signal. Die zweite Transfektion (Einzelklone 5C9) brachte eine deutliche Steigerung der Expression. Wurden die Zellen für den Versuch abtrypsinisiert, war der plgR nicht mehr nachweisbar. Sterne inidieren signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) zu untransfizierten MDCK-Zellen. (B) Die Bindung des dimeren IgA1 mit inkorporierter J-Kette konnte mit einer weiteren indirekten Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Dabei wurde ein ahu-k-gerichteter FITC-markierter Sekundärantikörper verwendet. Die Sterne verdeutlichen, dass dimeres IgA mit J im Gegensatz zu allen anderen Kontroll-IgA-Antikörpern signifikant ($p \leq 0,05$) dazu in der Lage, war an den plgR zu binden. Gezeigt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten.

Nachdem diese Voraussetzungen für den Nachweis der Transzytose erfüllt worden waren, wurde der Transzytoseassay etabliert. MDCK-Zellen besitzen die Eigenschaft, einmal auf einer porösen Oberfläche ausgesät, zu einer dichten Einzellschicht heranzuwachsen. Damit stellt diese Einzellschicht aus MDCK-Zellen eine typische Schicht aus Epithelzellen dar, mit der die Transzytose untersucht werden konnte. Zur Sicherheit wurde mittels eines Voltohmmeters der elektrische Widerstand der Einzellschichten gemessen. Der transepitheliale Widerstand (TER, transepithelial resistance) wird in Ohm (Ω) angegeben und ist ein Maß für die

Nachdem mittels des MDCK-Zellmodells nachgewiesen werden konnte, dass dimeres 225-IgA1 an den pIgR band und von diesem auf die apikale Seite einer Epithelzellschicht transportiert wurde, sollte dies auch in einem Modell überprüft werden, dass physiologischeren Bedingungen entsprechen würde. Dabei wurde eine humane Karzinomzelllinie der oberen Bronchialepithelien, Calu3, verwendet. Diese Zellen exprimieren endogen den humanen pIgR. Darüber hinaus wäre zu erwarten, dass diese Zellen auch den EGFR exprimieren. Eine indirekte Immunfluoreszenz mit murinen IgG1-Antikörpern, die gegen den EGFR und den humanen pIgR gerichtet sind, konnte zeigen, dass Calu3-Zellen im Vergleich mit den transfizierten MDCK Zellen deutlich weniger pIgR und zusätzlich den EGFR exprimieren (Abb. 40).

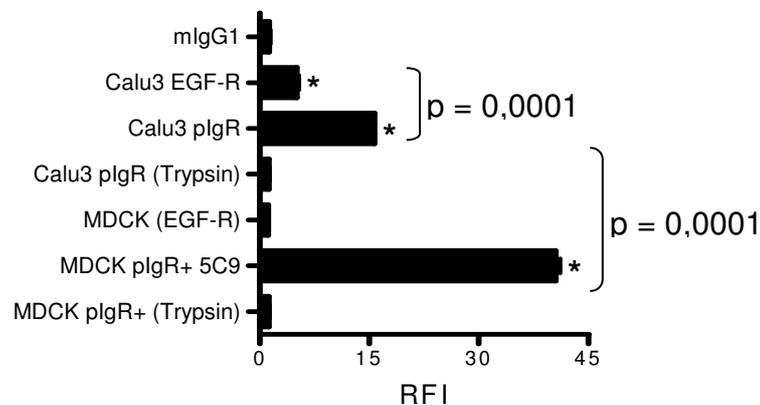
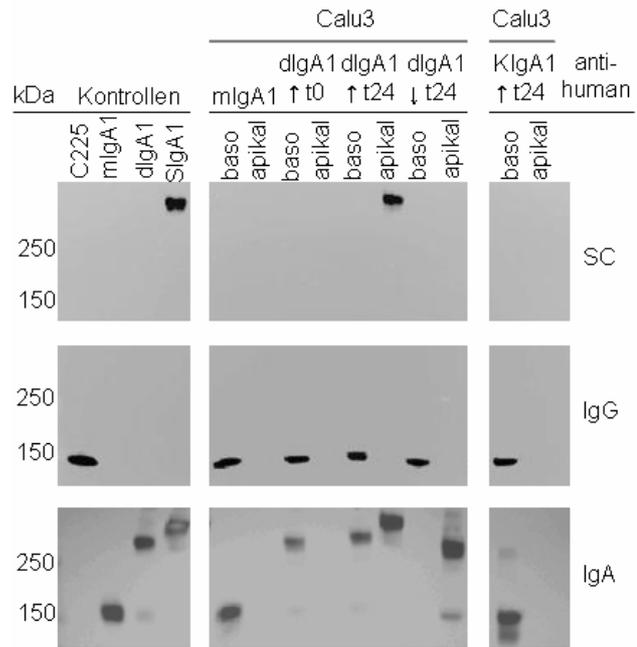


Abbildung 40: Nachweis der pIgR- und EGFR-Expression von Calu3-Zellen. Mittels einer indirekten Immunfluoreszenz und murinen IgG1-Antikörpern (mIgG1, Isotypkontrolle) konnte die Expression von pIgR und EGFR auf Calu3-Zellen nachgewiesen werden. Im Vergleich zu der MDCK Transfektante 5C9 exprimieren die Calu3-Zellen den pIgR und ebenfalls den EGFR. Sterne indizieren signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) zur Isotypkontrolle.

Dadurch entsteht eine Konkurrenz der beiden Rezeptoren um das dimere 225-IgA1, da dieses über die Fab-Teil hochaffin den EGFR und über den Fc-Teil bzw. die J-Kette den pIgR binden kann. Calu3-Zellen wachsen ebenfalls wie MDCK-Zellen, auf einer porösen Oberfläche zu einer stabilen Einzellschicht aus polarisierten Epithelzellen heran, mit dem Unterschied, dass die gemessenen Widerstände mit 1800-1900 Ω deutlich höher waren. Das Ergebnis des Transzytosestests mit Calu3-Zellen war, dass innerhalb von 24 h dimeres 225-IgA1 ausschließlich aber nicht vollständig transportiert wurde (Abb. 41). Eine mögliche Ursache für die niedrigere Transzytoserate könnte zum einen in der niedrigeren Expression des pIgR und zum anderen in der Expression des EGFR liegen.

Abbildung 41: Transzytose von dimerem 225-IgA1 im humanen Calu3-System.

Für den Transzytostest wurde in jedes basolaterale Kompartiment (baso) 225-IgG1 gegeben, um die Spezifität des Transportes und die Dichte der Einzellschicht zu überprüfen. Monomeres und dimeres IgA1 wurden am Zeitpunkt 0 (t0) in das basolaterale Kompartimente bzw. dimeres IgA1 ebenfalls in das apikale Kompartiment (apikal) gegeben und nach 24 h (t24) die Medien beider Seiten entnommen. Proben dieser Medien wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf PVDF-Membranen transferiert und mittels Peroxidase gekoppelter Antikörper gegen die humane sekretorische Komponente (SC), die humane gamma (IgG) und die humane alpha (IgA) Kette der Anteil an IgG, IgA und SC in beiden Kompartimenten untersucht. Die Auswertung der Proteinverteilung mittels Immundetektion ergab, dass innerhalb von 24 h ausschließlich dimeres 225-IgA1 von plgR positiven MDCK-Zellen vom basolateralen zum apikalen Kompartiment transportiert wurde. Gezeigt ist ein exemplarischer Nachweis von 7 unabhängigen Versuchen. Als Größenkontrollen wurden 225-IgG1, monomeres, dimeres und sekretorisches IgA aufgetragen.



Damit konnte im Rahmen dieser Transzytoseversuche ein für dimeres 225-IgA1 sehr wichtiger Aspekt der Funktionalität demonstriert werden. Das in dieser Arbeit rekombinant hergestellte dimere 225-IgA1 besaß die Eigenschaft an den polymeren Immunglobulin Rezeptor zu binden und von diesem von der basolateralen zur apikalen Seite mittels Transzytose transportiert zu werden. Auf der luminalen Seite konnte sekretorisches IgA nachgewiesen werden, was bedeutet, dass dimeres 225-IgA1 auch mit der extrazellulären Komponente des plgR, der SC, eine Verbindung eingegangen war.

3.2. Funktionelle Charakterisierung der EGFR-gerichteten IgA-Antikörper

3.2.1. Direkte Effektmechanismen der EGFR-gerichteten IgA-Antikörper

Die Wirkmechanismen von Antikörpern lassen sich unterscheiden in direkte Effekte, welche durch die Fab-Domänen vermittelt werden, und indirekte Effekte, welche durch die Fc-Domänen der Antikörper vermittelt werden. Im ersten Teil der

funktionellen Charakterisierung werden die direkten Effektmechanismen dargestellt, welche für in die in dieser Arbeit hergestellten IgA-Antikörper nachgewiesen wurden.

3.2.1.1 Blockade der Ligandenbindung

Die Fähigkeit den Liganden zu verdrängen stellt einen direkten Effektmechanismus der Antikörper dar. Um diesen Sachverhalt zu analysieren, wurde eine FITC-konjugierte Variante des EGF in An- und Abwesenheit von EGFR-spezifischen und -unspezifischen Antikörpern inkubiert. Als Zellmodell wurden A431-Tumorzellen verwendet, da diese eine sehr hohe Expression des EGFR aufzeigen. Die Verdrängung des Liganden durch einen EGFR-spezifischen Antikörper äußert sich in der konzentrationsabhängigen Abnahme der Fluoreszenz. In Relation zu der Fluoreszenzintensität mit EGF-FITC alleine berechnet sich die Hemmung der EGF-Bindung in %. Die Ergebnisse dieser Analysen zeigten, dass monomeres 225-IgA2 und dimeres 225-dIgA1 schon bei niedrigen Konzentrationen den Liganden verdrängten (Abb. 42). Dies drückte sich auch in den EC50-Werten aus: Für dimeres 225-IgA1 betrug der EC50-Wert 7,7 µg/ml, für monomeres 225-IgA1 18,1 µg/ml, für 225-IgG1 10,9 µg/ml und für monomeres 225-IgA2 7,1 µg/ml. Das monomere 225-IgA1 bewirkte in diesem Versuchsaufbau sowohl im Vergleich mit dem IgA2, dem 225-IgA1-Dimer und dem 225-IgG1 erst bei höheren Konzentrationen die Verdrängung des Liganden. Die Unterschiede waren im mittleren Konzentrationsbereich zu finden. Bei einer maximalen Konzentration von 200 µg/ml waren alle Konstrukte gleichermaßen in der Lage den Liganden zu verdrängen.

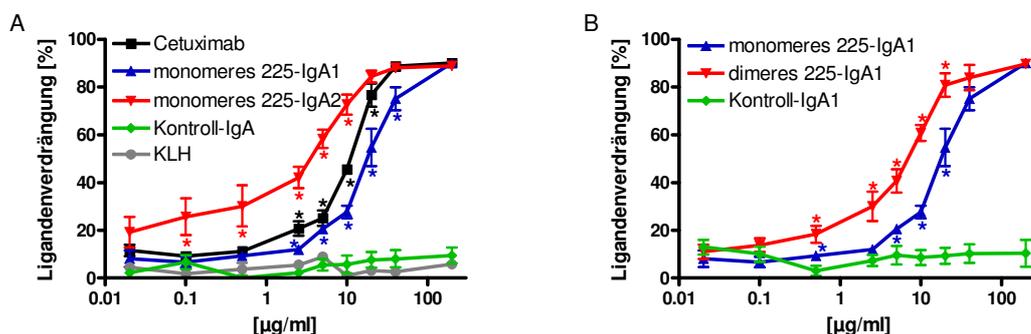


Abbildung 42. EGFR-gerichtete IgA-Antikörper blockieren die Bindung des Liganden an den EGFR. Im Vergleich der Monomere (A) zeigte der 225-IgA2 Isotyp die stärkste Wirkung. Dagegen verdrängte dimeres 225-IgA1 den Liganden (EGF) deutlich effektiver als monomeres 225-IgA1 (B). Bei maximaler Konzentration zeigen allerdings alle EGFR-spezifischen Antikörper maximale Verdrängung. Sterne indizieren Signifikanzen ($p \leq 0,05$) zum unverdrängten Liganden. Zu sehen sind Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

3.2.1.2. EGFR-gerichtete IgA-Antikörper beeinflussen die Tumorzellviabilität

Als einen weiteren direkten Effektmechanismus wurde die Inhibition der Tumorzellviabilität untersucht. Die Zellviabilität kann durch die Aktivität von Enzymen nachgewiesen werden, welche an bestimmten Stoffwechselwegen beteiligt sind. Im vorliegenden Versuchsaufbau stellt das Maß des fehlenden Substratumsatzes (MTS und PMS) durch mitochondriale Dehydrogenasen, ein Maß für die Wirkung der Antikörper auf die Viabilität der Zelle dar. Aus diesem Grund wurden die Antikörper in Zellviabilitätstests mit drei verschiedenen Zielzellen getestet (Abb. 43).

Als erstes Modell diente ein in diesem Labor etabliertes BaF3-Modell (Peipp 2008). Diese murinen B-Lymphom-Zellen wurden mit dem humanen EGFR transfiziert. Die ursprünglich IL-3 abhängig wachsenden BaF3-Zellen waren damit in der Lage, auch ausschließlich in Abhängigkeit von EGF zu proliferieren. Unter diesen Bedingungen wurden diese Zellen über drei Tage hinweg den verschiedenen Antikörpern im Rahmen von Dosiswirkungskurven ausgesetzt. Bei dem zweiten Modell handelte es sich um eine humane Kolonkarzinom-Zelllinie, DiFi, und das dritte Modell stellten A431-Tumorzellen dar. Es konnte beobachtet werden, dass die verschiedenen EGFR-spezifischen Antikörper die Zellviabilität unterschiedlich effizient beeinträchtigten (Abb. 43). Dabei zeigte monomeres 225-IgA2 die signifikant niedrigste Effektivität, wobei das Tumorzellwachstums auf $67,3 \pm 12,9$ % (BaF3), $30,6 \pm 3,6$ % (DiFi) und $89,8 \pm 4,8$ % (A431) reduziert werden konnte. Monomeres 225-IgA1 zeigte deutlich stärkere Effekte bei allen drei Zellmodellen ($56,0 \pm 9,5$ % (BaF3), $23,3 \pm 1,1$ % (DiFi), $82,2 \pm 2,2$ % (A431)). Die Inkubation der Tumorzellen mit dem 225-IgG1-Antikörper reduzierte deren Viabilität auf $43,9 \pm 10,6$ % (BaF3), $18,2 \pm 4,1$ % (DiFi), und $71,9 \pm 3,3$ % (A431). Im direkten Vergleich mit monomeren IgA vermittelte der 225-IgG1 somit den stärksten Effekt. Wurde monomeres und dimeres 225-IgA1 miteinander verglichen, zeigte dimeres 225-IgA1 einen stärkeren Einfluss auf die Tumorzellviabilität als monomeres 225-IgA1. Die Reduktion der Viabilität durch Inkubation der Tumorzellen mit dimerem 225-IgA1 betrug $73,2 \pm 5,4$ % (A431), $17,6 \pm 0,9$ % (DiFi) und $46,8 \pm 10,8$ % (BaF3). Allerdings konnte beobachtet werden, dass bei steigender Konzentration ein Sättigungseffekt eintrat, so dass die Kurven von monomerem und dimerem IgA1 sich annäherten.

Charakterisierung rekombinanter IgA-Antikörper gegen den EGFR
- Ergebnisse -

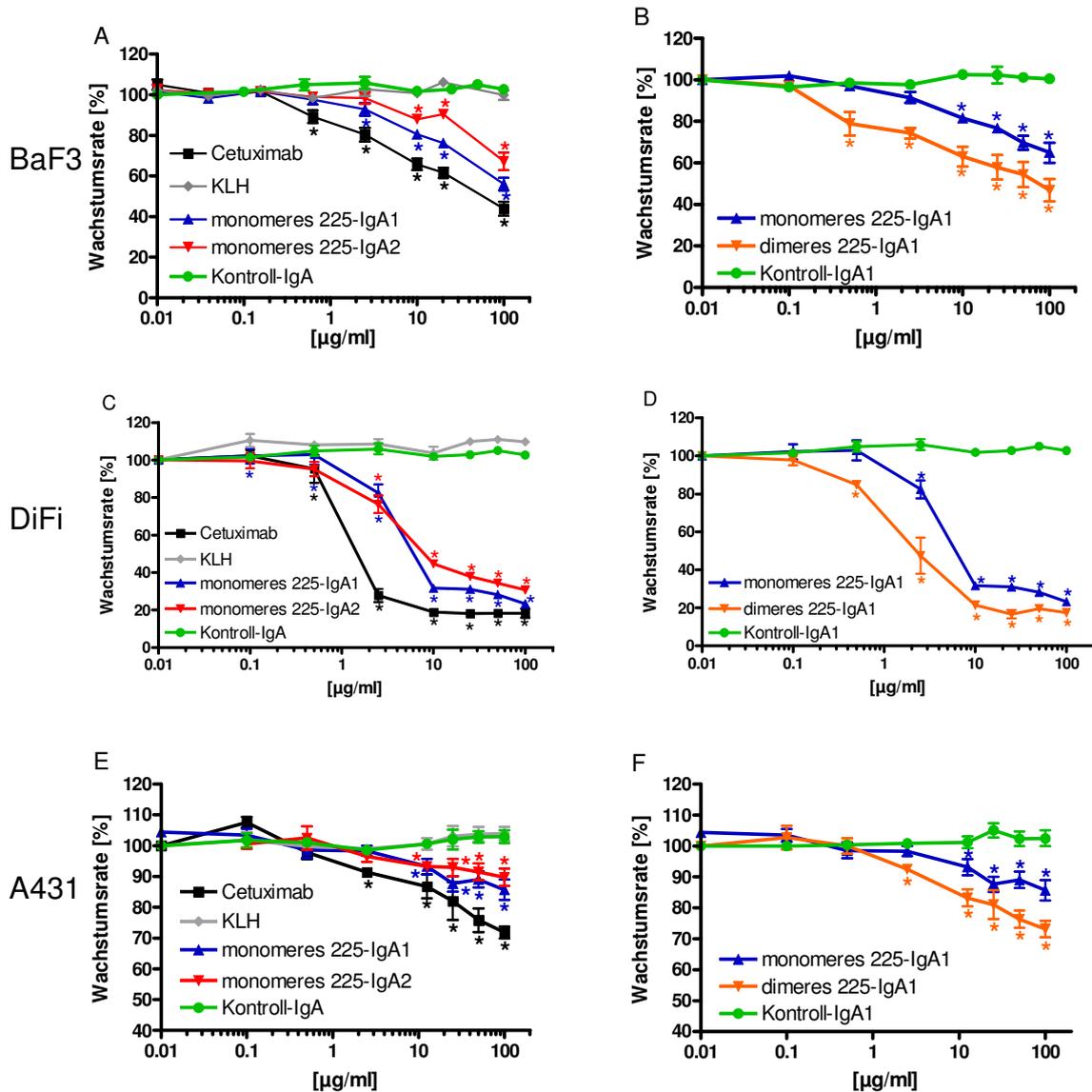


Abbildung 43: EGFR-Antikörper reduzieren die Zellviabilität von Tumorzellen. Untersucht wurde die Fähigkeit der EGFR-Antikörper, das Wachstum von EGFR-transfizierten BaF3-Zellen (A und B), von DiFi-Zellen (C und D) und von A431-Zellen (E und F) zu inhibieren. Beide IgA-Monomere, 225-IgA1 als 225-IgA2, inhibierten die Zellviabilität allerdings nicht im gleichen Ausmaß wie der vergleichbare 225-IgG1 (A, C, E). Am stärksten inhibiert wurden Kolonkarzinomzellen (C und D), gefolgt von den murinen B-Lymphom-Zellen (A und B) und am schlechtesten wurden epidermoide Karzinomzellen (E und F) in ihrem Wachstum durch die Anwesenheit von EGFR-Antikörpern gehemmt. Sterne indizieren Signifikanzen $p \leq 0,05$ im Vergleich zum irrelevanten KLH. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Im Vergleich der einzelnen Zellmodelle untereinander konnte festgestellt werden, dass die Kolonkarzinom-Zelllinie DiFi am stärksten in ihrer Viabilität gehindert werden konnte. Ab einer Konzentration von 2 µg/ml konnte das Wachstum auf unter 20 %

reduziert werden. Allerdings zeigten das dimere 225-IgA1 und der 225-IgG1 schon bei niedrigeren Konzentrationen eine deutlich stärkere Wirkung als das monomere 225-IgA1. Die A431 Tumorzellen ließen sich nur schwach in ihrer Viabilität hemmen. Die EGFR transfizierten BaF3 Zellen ließen sich dagegen stärker als die A431 aber weniger als die DiFi Zellen im Wachstum hemmen.

3.2.2 Indirekte Wirkmechanismen der EGFR-gerichteten IgA-Antikörper

Nachdem gezeigt werden konnte, dass sowohl beide monomere 225-IgA1 wie –IgA2 sowie das dimere 225-dIgA1 die Bindung des Liganden EGF an den EGFR inhibieren und das Wachstum von Tumorzellen hemmen konnten, wurden in den folgenden Experimenten die indirekten Effektmechanismen der IgA-Antikörper untersucht. Kommerziell eingesetzte IgG1-Antikörper sind in der Lage über ihre Fc-Domäne Komplementproteine zu rekrutieren und CDC zu vermitteln (Brüggemann 1987) sowie über Fc-Rezeptoren an Effektorzellen wie Monozyten, NK-Zellen und zum Teil auch Granulozyten zu binden und dadurch die ADCC zu vermitteln (Bibeau 2009, Peipp 2008). Bezüglich dieses Aspektes besteht ein wesentlicher Unterschied zwischen IgG- und IgA-Antikörpern, da letztere über den IgA-Fc-Rezeptor Fc α RI hauptsächlich neutrophile Granulozyten ansprechen (Dechant 2008, Beyer 2009). In einem ersten Versuch wurde zunächst untersucht ob die Antikörper mit unbehandeltem peripherem Vollblut in der Lage waren, ADCC zu vermitteln. Des Weiteren wurde das Vollblut in zwei Effektorpopulationen, PMN und MNC, aufgetrennt (Abb. 44).

Das Ergebnis war, dass 225-IgA-Antikörper effizient in der Lage waren, PMN für die Lyse von Tumorzellen zu rekrutieren. Der 225-IgG1 rekrutierte sowohl PMN als auch MNC für die Lyse von A431-Tumorzellen. Allerdings konnte mit unfraktionierten Vollblut keine signifikante Lyse der Zielzellen durch 225-IgG1 vermittelten ADCC erzielt werden. Im Gegensatz induzierten alle 225-IgA-Antikörper ADCC von A431-Zellen mit Vollblut. Dabei war monomeres 225-IgA2 eine höhere Lyserate induziert worden, als mit beiden 225-IgA1-Varianten, zwischen denen kein Unterschied festgestellt werden konnte.

Charakterisierung rekombinanter IgA-Antikörper gegen den EGFR
- Ergebnisse -

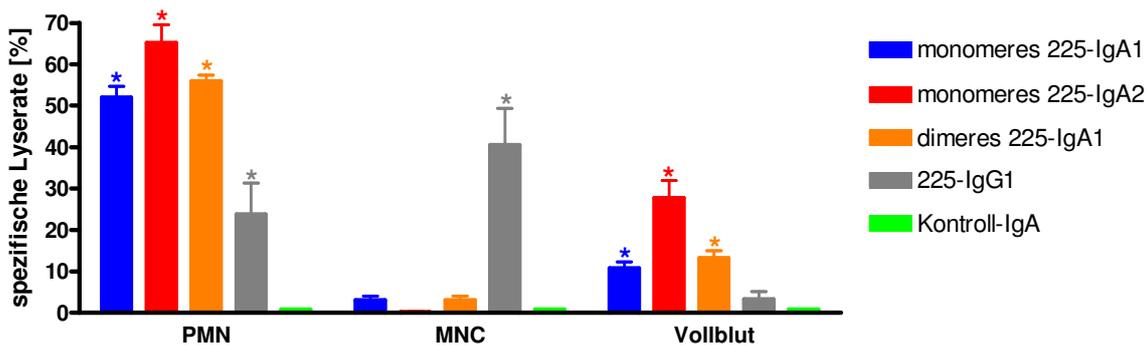


Abbildung 44: Die EGFR-IgG- und IgA-Antikörper rekrutieren für die Induktion von ADCC aus peripherem Vollblut verschiedene Effektorzellen. Dies war ein Vorversuch zum Nachweis der Vermittlung von Antikörper abhängiger Zytotoxizität durch die verschiedenen EGFR-gerichteten IgA- und IgG-Antikörper mit unfraktioniertem Vollblut, isolierten PMN und MNC. Die 225-IgA-Antikörper waren sehr effizient im Induzieren von ADCC von A431-Zellen mit unfraktioniertem Vollblut und besonders mit isolierten PMN aber nicht mit MNC. Dagegen war der vergleichbare 225-IgG1 in der Lage, beide isolierten Effektoren zu rekrutieren, jedoch konnte im Vollblut keine signifikante Lyse nachgewiesen werden. Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) zum Kontroll-IgA sind durch Sterne gekennzeichnet. Gezeigt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen von fünf unabhängigen Experimenten.

In einem weiteren Schritt wurde untersucht, in welchem Maße die rekombinant hergestellten 225-IgA-Antikörper in der Lage waren, isolierte PMN in Abhängigkeit von der Konzentration des Antikörpers und dem Effektorzell- zu Zielzell-Verhältnis für die Lyse von Tumorzellen zu rekrutieren. Im Rahmen von $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungstests wurden A431-, A1207- und DiFi-Zellen als Zielzellmodell verwendet. Diese Zielzellen wurden für zwei Stunden mit radioaktiven $^{51}\text{Chrom}$ inkubiert. Nachdem die Zellen dieses aufgenommen hatten, wurden sie mit den Antikörpern 225-IgA1, 225-IgA2, 225-IgG1, 225-dIgA1 und einem unspezifischen IgA-Antikörper (Kontroll-IgA), sowie aufgereinigten PMN (Verhältnis Zielzelle:PMN 1:80) für drei Stunden koinkubiert. Mit diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass alle drei hergestellten 225-IgA-Antikörper ADCC mit PMN vermitteln konnten (Abb. 45). Dabei konnten mit monomerem 225-IgA2 die höchsten Lyseraten induziert werden. Mit monomerem 225-IgA1 waren dagegen nur mittlere Lyseraten bewirkt worden. Der vergleichbare 225-IgG1 zeigte in diesen Versuchsreihen nur eine geringe Wirkung. Damit konnte gezeigt werden, dass IgA-Antikörper effizienter als IgG-Antikörper PMN für die ADCC vermittelte Lyse von Tumorzellen rekrutieren (Abb. 45).

Charakterisierung rekombinanter IgA-Antikörper gegen den EGFR
- Ergebnisse -

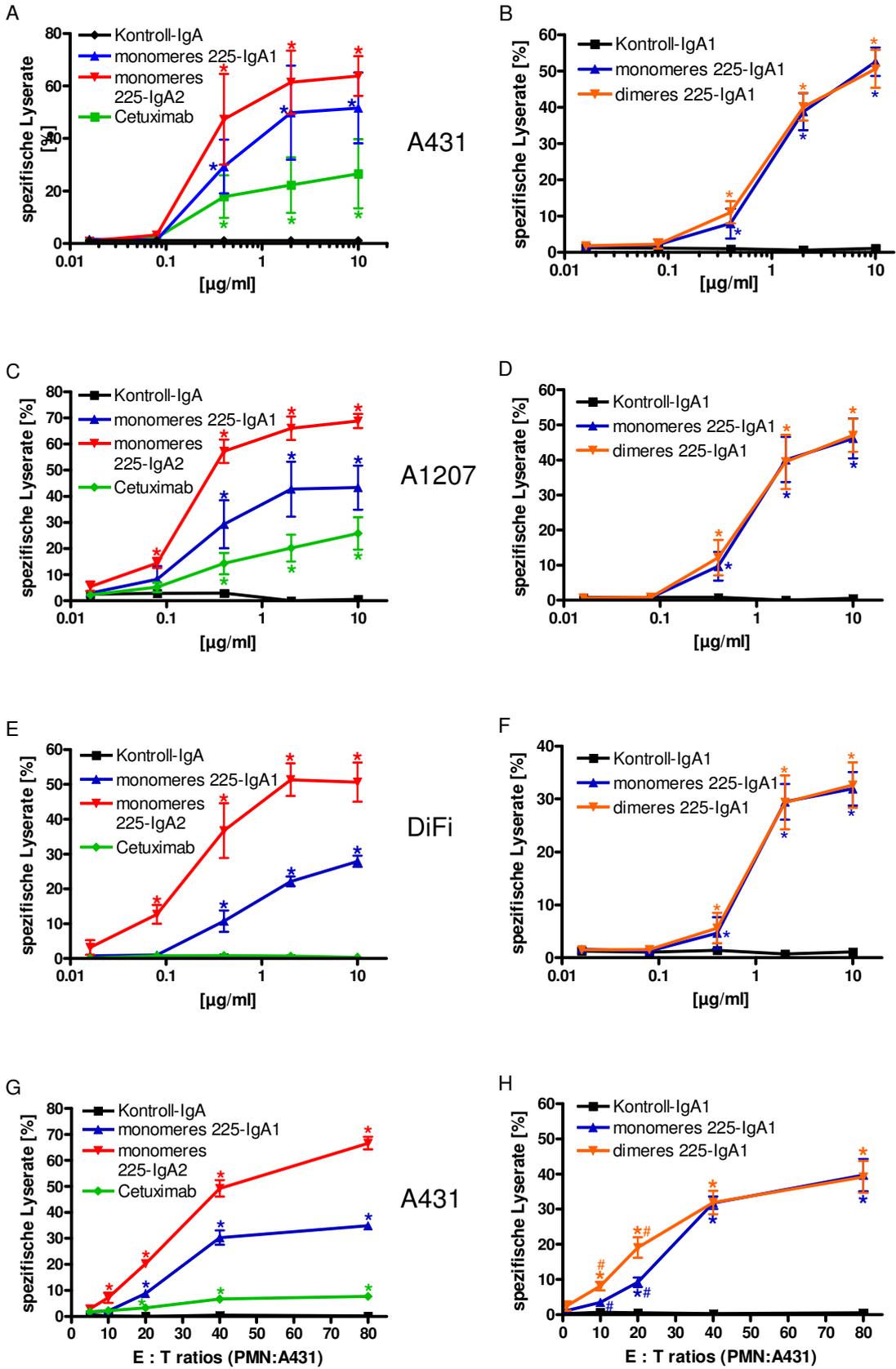


Abbildung 45: EGFR-gerichtete IgA-Antikörper sind in der Lage isolierte PMN für ADCC von Tumorzellen zu rekrutieren. Im Rahmen dieser Versuchsreihen konnte gezeigt werden, dass monomeres 225-IgA2, 225-IgA1 und dimeres 225-IgA1 isolierte PMN rekrutieren und ADCC-basierte Lyse von Tumorzellen induzieren konnten. Bei allen drei Zielzellmodellen, A431 (A, B), A1207 (C, D) und DiFi (E, F) vermittelte monomeres 225-IgA2 die höchsten Lyseraten. Monomeres und dimeres 225-IgA1 induzierten gleichermaßen erst ab einer Konzentration von 0,4 µg/ml signifikante Lyseraten. Die isolierten PMN induzierten mit dem vergleichbaren 225-IgG1 auch bei hohen Konzentrationen nur gering signifikante Lyseraten. Außerdem gab es Unterschiede zwischen den einzelnen Tumorzellen. In der Reihenfolge DiFi, A431 und A1207 konnte zunehmend höhere Lyseraten erzielt werden. (G) Auch bei niedrigeren E:T-Verhältnissen stimulieren beide monomeren 225-IgA-Antikörper ADCC von A431-Zellen im Gegensatz zum 225-IgG1. Dabei war 225-IgA2 effektiver als 225-IgA1. (H) Bei E:T-Verhältnissen von 10 und 20:1 vermittelte dimeres 225-IgA1 signifikant höhere Lyseraten als monomeres 225-IgA1. Ab einem Verhältnis von 40:1 zeigen beide Konstrukte keine unterschiedliche Wirkung, entsprechend den vorangegangenen Versuchen (B, D, F). Sterne indizieren signifikante Unterschiede zu unspezifischen Antikörpern (Kontroll-IgA-Antikörper), Kreuze markieren signifikante Unterschiede zwischen dimerem und monomerem 225-IgA1 ($p \leq 0,05$). Zu sehen sind Mittelwerte mit Standardabweichungen von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Daneben wurde ebenfalls untersucht, ob die Antikörper auch bei niedrigeren Effektorzell- zu Zielzell-Verhältnissen (E:T-Ratio) ADCC durch die Rekrutierung von PMN vermitteln konnten (Abb. 45 G, H). Untersucht wurden Verhältnisse von 80:1 bis 5:1. Das monomere 225-IgA2 war in diesem Fall das effektivste Antikörperkonstrukt. Auch bei niedrigen E:T-Verhältnissen von 10:1 vermittelte das 225-IgA2-Monomer noch signifikante Lyse von A431-Zellen. Bei höheren E:T-Verhältnissen waren durch 225-IgA2 signifikant höhere Lyseraten induziert worden als mit 225-IgA1. Beide 225-IgA-Monomere waren effizienter als 225-IgG1. Im direkten Vergleich zwischen monomerem und dimerem 225-IgA1 (Abb. 45 B, D, F, H) zeigte sich ein Unterschied bei niedrigen E:T Ratios, da dimeres 225-IgA1 hier effektiver war. Ab einer E:T-Ratio von 40:1 induzierten die Präparationen von dimerem und monomerem 225-IgA1 gleichermaßen ADCC bei allen Zellmodellen.

Die maximalen Lyseraten betragen für A431 mit 225-IgG1 $19,9 \pm 4,8\%$, mit 225-IgA1 $52,6 \pm 6,7\%$ und mit 225-dIgA1 $50,6 \pm 9,1\%$, für A1207 mit 225-IgG1 $14,9 \pm 3,3\%$, mit 225-IgA1 $46,9 \pm 9,9\%$, mit 225-dIgA1 $47,1 \pm 8,1\%$ und für DiFi mit 225-IgG1 $3,8 \pm 1,8\%$, mit 225-IgA1 $31,9 \pm 5,5\%$ und mit dessen dimerer Variante 225-dIgA1 $32,7 \pm 7,5\%$. Maximale Lyseraten für die einzelnen Konstrukte und Zellmodelle waren für A431 Zellen mit 225-IgG1 $24,5 \pm 22,7\%$, mit 225-IgA1 $51,6 \pm 23,4\%$, mit 225-IgA2 $63,8 \pm 13,1\%$, für A1207 Zellen mit $25,8 \pm 10,6\%$, mit 225-IgA1 $43,3 \pm 14,4\%$ und mit

225-IgA2 $68,8 \pm 4,6\%$, für DiFi Zellen mit 225-IgG1 $0,52 \pm 0,3\%$, mit 225-IgA1 $27,9 \pm 2,8\%$ und mit monomerem 224-IgA2 $50,7 \pm 9,7\%$. Zur besseren Veranschaulichung des Potentials der einzelnen Antikörper wurden die maximalen Lyseraten in einem Diagramm (Abb. 46) zusammengefasst, auch um die Unterschiede zwischen den drei Zelltypen hervorzuheben.

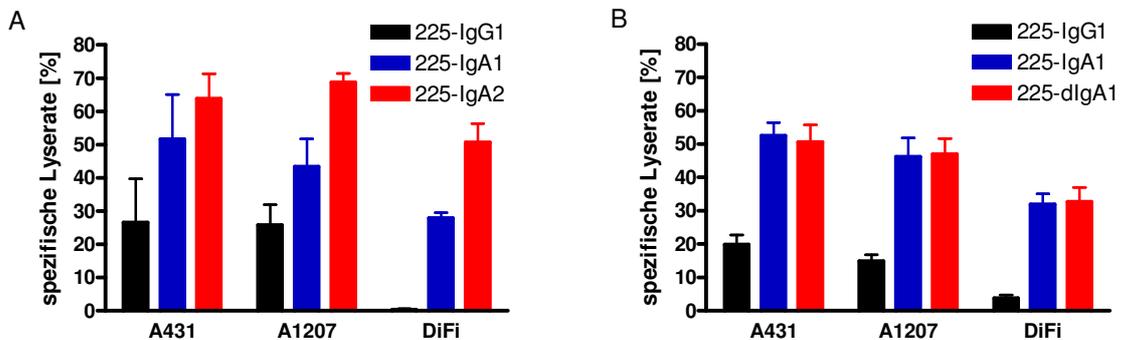


Abbildung 46: Maximale ADCC-Lyseraten von Tumorzellen induziert durch EGFR-Antikörper.

(A) Alle drei Zielzellen, A431, A1207 und DiFi, wurden mittels beider IgA-Monomere und isolierten PMN lysiert. 225-IgG1 zeigte allerdings keine Wirkung bei den DiFi und bei den anderen Zellmodellen die niedrigsten Lyseraten. Monomeres 225-IgA2 übertrifft das monomere 225-IgA1 in punkto Effektivität. (B) Dimeres und monomeres 225-IgA1 vermittelt mit gleicher Effektivität die Lyse von Tumorzellen. Deutlich zu sehen ist hier die Überlegenheit der EGFR-gerichteten IgA-Antikörper gegenüber dem 225-IgG1 PMN für ADCC von Tumorzellen zu rekrutieren. Zu sehen sind Mittelwerte mit Standardabweichungen von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Zusätzlich zu den isolierten PMN wurde ebenfalls das Potential der einzelnen Antikörper zur Rekrutierung von MNC als Effektorzellen untersucht. Die präparierten MNC wurden im gleichen Versuchsaufbau analog zu den PMN-Versuchen mit den verschiedenen chromierten Zielzellen und den verschiedenen Antikörpern koinkubiert. Das Ergebnis war, dass erwartungsgemäß nur die Kombination aus 225-IgG1 und MNC in der Lage war, die Lyse der Tumorzellen zu induzieren. Dabei ließen sich A431 und A1207 gleichermaßen und die DiFi am schlechtesten lysieren. Die maximalen Lyseraten betragen mit 225-IgG1 für A431 $41,1 \pm 16,7\%$, für A1207 $38,5 \pm 5,1\%$ und für DiFi $35,1 \pm 9,1\%$. Weder die beiden Monomere, 225-IgA1 und 225-IgA2, noch das Dimer 225-dlgA1 besaßen die Fähigkeit innerhalb einer dreistündigen Inkubationsphase aufgereinigte MNC für ADCC zu rekrutieren. Die Ergebnisse wurden in Abbildung 47 graphisch dargestellt.

Charakterisierung rekombinanter IgA-Antikörper gegen den EGFR
- Ergebnisse -

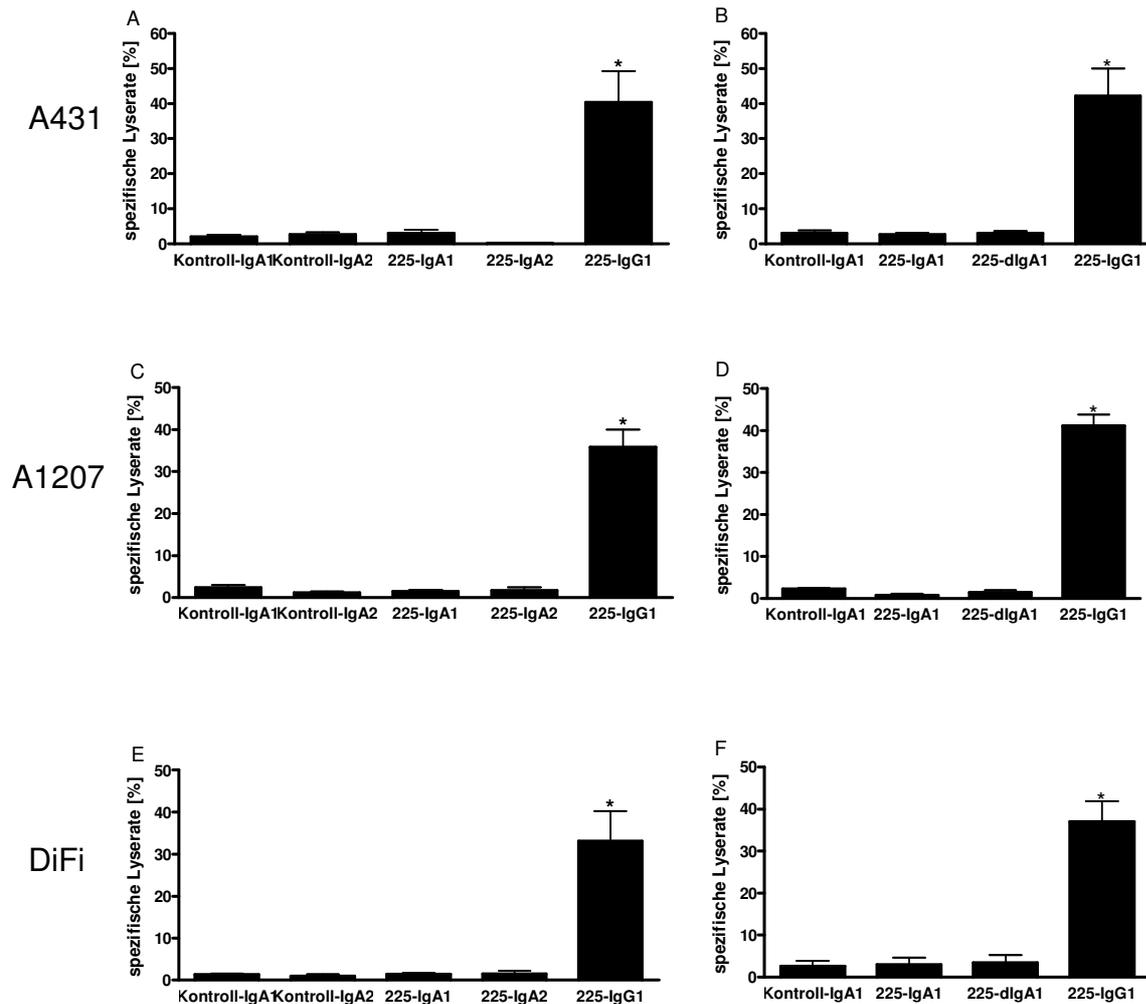


Abbildung 47: EGFR-Antikörper induzieren keine ADCC mit isolierten MNC. Sowohl A431 (A und B), als auch A1207 (C und D) und DiFi (E und F) wurden nur lysiert, in der Kombination aus 225-IgG1 und aufgereinigten MNC. Weder die beiden Monomere (A, C, E), 225-IgA1 und 225-IgA2, als auch das Dimer (B, D, F), 225-dlgA1, waren in der Lage ADCC mit isolierten MNC zu vermitteln. Sterne indizieren Signifikanzen im Vergleich zum Kontroll-IgA1-Antikörper ($p \leq 0,05$). Zu sehen sind Mittelwerte mit Standardabweichungen von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Monozyten stellen einen Teil der MNC-Fraktion dar. Da diese neben Fc γ -Rezeptoren auch den Fc α RI exprimieren, sollten IgA-Antikörper auch in der Lage sein, Monozyten zu rekrutieren. Die Ergebnisse der vorangegangenen Versuche zeigten aber, dass mit der Kombination aus EGFR-gerichteten IgA-Antikörpern und MNC kein ADCC von Tumorzellen zu induzieren war. Aus diesem Grund wurden mittels einer alternativen Aufreinigungsstrategie über Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation und Magnetfeldseparation Monozyten isoliert. Diese reinen Monozyten wurden im Rahmen eines $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungstests mit den EGFR-gerichteten IgA- sowie Kontroll-Antikörpern mit A431-Tumorzellen inkubiert. Darüber hinaus wurde die

finale Inkubationsphase auf 18 h verlängert. In einer vorangegangenen Arbeit wurden 18 h als erforderliche Inkubationszeit für einen ADCC mit Monozyten ermittelt (Schneider-Merck 2010). Unter diesen Testbedingungen konnte gezeigt werden, dass die EGFR-gerichteten IgA-Antikörper in der Lage waren, auch Monozyten zu rekrutieren, um die ADCC basierte Lyse von A431-Tumorzellen zu induzieren (Abb. 48).

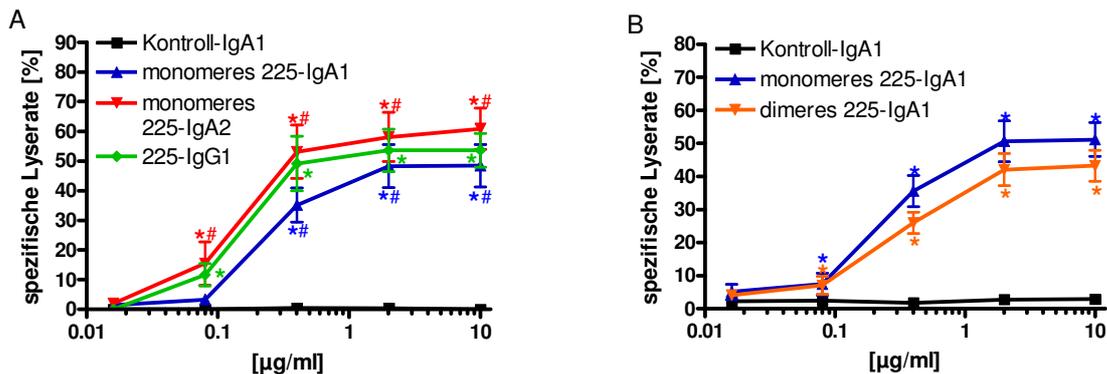


Abbildung 48: EGFR-Antikörper rekrutieren isolierte Monozyten für ADCC von A431-Tumorzellen. Isolierte Monozyten wurden im Verhältnis 80:1 mit Tumorzellen und den entsprechenden Antikörpern für 18 h inkubiert. Die graphische Darstellung der Ergebnisse zeigte, dass die EGFR-gerichteten IgA-Antikörper ähnlich zum 225-IgG1 in der Lage waren mittels Monozyten ADCC von A431-Zellen zu induzieren. Sterne indizieren signifikante ($p \leq 0,05$) Unterschiede zum Kontroll-IgA1, Kreuze symbolisieren signifikante ($p \leq 0,05$) Unterschiede zwischen 225-IgA1 und 225-IgA2. Gezeigt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen von mindestens fünf unabhängigen Experimenten.

Bei diesen Versuchen war mit monomerem 225-IgA2 mit Monozyten signifikante Lyse von A431-Tumorzellen ab einer Konzentration von 0,08 $\mu\text{g/ml}$ vermittelt worden. Der 225-IgG1 induzierte ebenfalls bei dieser Konzentration signifikante Lyseraten, jedoch in geringerem Ausmaß als 225-IgA2. Monozyten vermittelten mit monomerem 225-IgA1 signifikante Lyseraten ab einer Konzentration von 0,4 $\mu\text{g/ml}$ und damit weniger effektiv als mit monomerem 225-IgA2 und 225-IgG1. Diesen Sachverhalt bestätigen auch die maximalen Lyseraten. Diese betragen für monomeres 225-IgA2 $60,9 \pm 13,9$ %, für monomeres 225-IgA1 $51,2 \pm 11,4$ % und für 225-IgG1 $53,6 \pm 11,5$ %. Die spezifischen Lyseraten, welche mit dimerem 225-IgA1 erzielt werden konnten waren in diesem Versuch niedriger als mit monomerem 225-IgA1. Diese Unterschiede waren aber nicht signifikant. Die maximalen Lyseraten betragen $48,4 \pm 14,3$ % für monomeres 225-IgA1 und $43,3 \pm 10,5$ % für dimeres 225-

IgA1. Der 225-IgG1 war ähnlich effizient Monozyten zu rekrutieren wie die rekombinant hergestellten 225-IgA-Antikörper. Dies lässt vermuten, dass die isolierten Monozyten unterschiedliche Fc-Rezeptoren exprimieren. Aus diesem Grund wurde mittels einer direkten Immunfluoreszenz untersucht, welche Fc-Rezeptoren die eingesetzten Monozyten exprimieren (Abb. 49). Die Ergebnisse zeigten, dass die Monozyten CD14 exprimierten, einen Oberflächenmolekül spezifisch für Monozyten und Makrophagen. Daneben konnten drei Fc-Rezeptoren auf der Oberfläche der Monozyten nachgewiesen werden: der FcγRII (CD32) und der FcγRI (CD64), beide Fc-Rezeptor für IgG-Antikörper und der IgA-Fc-Rezeptor FcαRI (CD89). Die Monozyten exprimierten somit Fc-Rezeptoren mit niedriger (CD32) und hoher (CD64) Affinität zu IgG1-Antikörpern. Über letzteren können IgG1-Antikörper effizient Monozyten rekrutieren, wodurch die hohen Lyseraten (Abb. 48 A) des 225-IgG1 erklärt werden können.

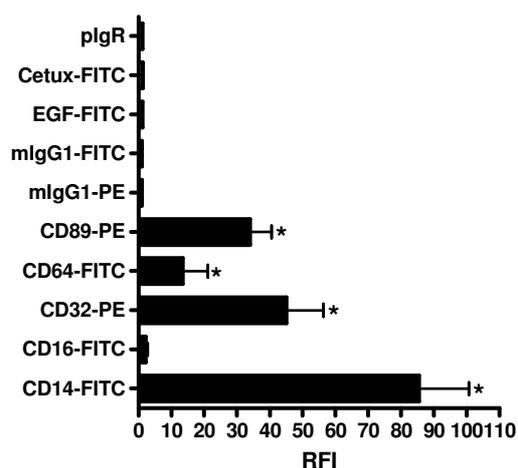


Abbildung 49: Die isolierten Monozyten exprimieren verschiedene Fc-Rezeptoren unterschiedlich stark. Eine direkte Immunfluoreszenz zeigte, dass CD32, CD89 und CD64 exprimiert werden. Sterne markieren signifikante Unterschiede zu Isotypkontrollen ($p > 0,05$). Signifikante Unterschiede zwischen den Rezeptoren sind angegeben.

Zuletzt wurde die Wirksamkeit der Antikörper unter Verwendung von unfraktioniertem Vollblut auf verschiedene Tumorzellen untersucht (Abb. 50). In diesem Versuchsaufbau konnte mit dem EGFR-Antikörper 225-IgG1 keine Lyse von Tumorzellen induziert werden. Die EGFR-gerichteten IgA-Antikörper zeigten dagegen eine höhere Wirksamkeit. Die monomere und dimere Variante des 225-IgA1 zeigten beide eine schwache Wirksamkeit mit maximalen Lyseraten von $8,9 \pm 1,1$ % und von $8,4 \pm 0,4$ % für monomeres bzw. dimeres IgA1. Das Monomer des 225-IgA2 vermittelte schon ab einer Konzentration von $0,8 \mu\text{g/ml}$ die Lyse von A431-Zellen schon zu fast 14 % und steigerte die Lyserate auf ein Maximum von $23,5 \pm 2,1$ %.

Charakterisierung rekombinanter IgA-Antikörper gegen den EGFR
- Ergebnisse -

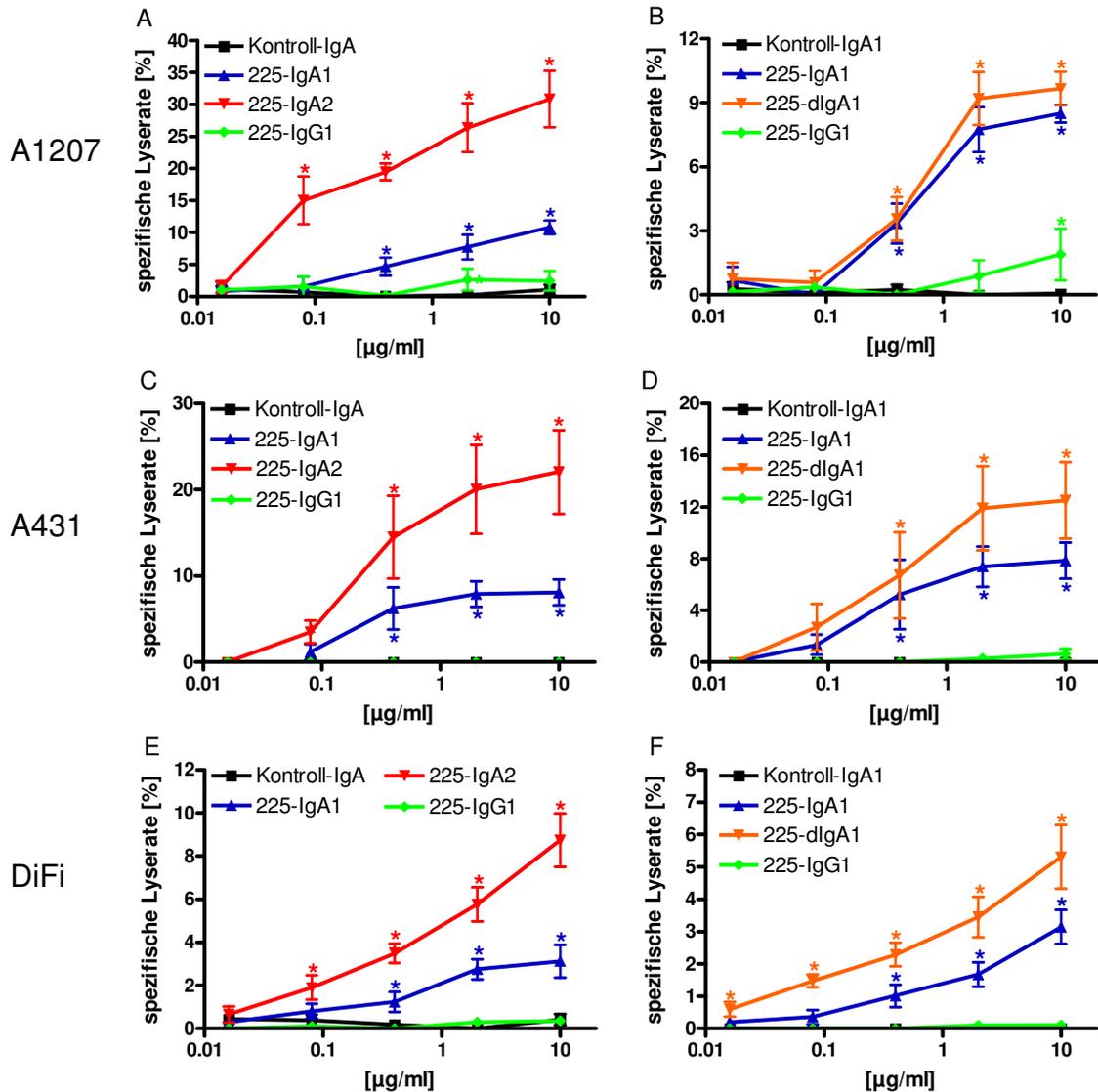


Abbildung 50: EGFR-gerichtete IgA-Antikörper vermitteln ADCC mit unfraktioniertem Vollblut.

(A, C, E) Im direkten Vergleich zeigten die monomeren Antikörper sehr unterschiedliche Effizienzen. 225-IgG1 vermittelte keine ADCC mit unfraktioniertem Vollblut. Monomeres 225-IgA1 zeigte eher schwache Lyseraten. Monomeres 225-IgA2 zeigte dagegen in diesen ⁵¹Chrom-Freisetzungstests die stärkste Wirkung. (B, D, F) Mit unfraktioniertem Vollblut vermittelte dimeres IgA1 die Lyse von Karzinomzellen stärker als monomeres 225-IgA1. Als Zielzellen wurden A1207 (A, B), A431 (C, D) und DiFi (E, F) verwendet. Die Ergebnisse waren bei allen drei Modellsystemen tendenziell gleich. Sterne indizieren Signifikanzen im Vergleich zu Kontroll-IgA-Antikörpern ($p \leq 0,05$). Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen von mindestens vier unabhängigen Experimenten.

Für die Glioblastomzellen A1207 konnten die höchsten Lyseraten verzeichnet werden. Mit dem 225-IgA2-Monomer wurden maximale Lyseraten von $30,8 \pm 8,8$ % erreicht, während die 225-IgA1-Konstrukte maximale Lyse von $10,8 \pm 2,2$ % bzw. $9,7 \pm 2,2$ % für Dimer bzw. Monomer vermittelten. Die maximalen Lyseraten im Falle

der A431-Karzinomzellen waren niedriger und betragen für monomeres 225-IgA2 $22,1 \pm 9,7$ %, für monomeres 225-IgA1 $8,1 \pm 3,1$ % und für dimeres 225-IgA1 $12,5 \pm 5,9$ %. Die 225-IgA1-Antikörper induzierten von Kolonkarzinomzellen (DiFi) nur minimale Lyseraten von ca. $3,1 \pm 1,0$ % für das Monomer und $5,3 \pm 1,9$ % für das Dimer. Das monomere 225-IgA2 war leicht effektiver mit Maximalwerten um $8,7 \pm 2,5$ %. Alle EGFR-gerichteten IgA-Antikörper waren signifikant effektiver als der vergleichbare 225-IgG1. Die in dieser Arbeit hergestellten IgA-Antikörper vermittelten somit auch mit unfraktioniertem Vollblut die Lyse von Tumorzellen, wobei das monomere 225-IgA2 die stärkste Wirkung zeigte und das 225-IgA1-Dimer effektiver ADCC induzierte als das Monomer.

3.2.3. Nachweis der Spezifität der EGFR-gerichteten IgA-Antikörper

In den folgenden Versuchen sollte die Spezifität der Antikörper nachgewiesen werden. Die zentrale Fragestellung war hier, ob die beobachteten Effekte spezifisch für das Antigen EGFR waren. Um diesen Sachverhalt zu klären wurden CD20-positive aber EGFR-negative Raji-B-Lymphom-Zellen und der für CD20-spezifische Antikörper Rituximab verwendet. Als Effektoren wurden aus peripherem Vollblut PMN, MNC und Plasma isoliert, da Rituximab im Gegensatz zu EGFR-spezifischen IgG-Antikörpern alleine in der Lage ist über CD20 CDC von Tumorzellen zu vermitteln (Di Gaetano 2003). Die $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungstests bestätigten, dass Rituximab war in der Lage mit allen drei Effektoren, PMN, MNC und Plasma die Lyse von Raji Zellen zu vermitteln (Abb. 51 A), die entsprechenden Lyseraten betragen mit PMN als Effektoren $20,4 \pm 3,5$ %, mit MNC $52,1 \pm 13,9$ % und mit Plasma $18,4 \pm 4,9$ %. Dagegen zeigten die EGFR-spezifischen ebenso wie die -unspezifischen Antikörper keinerlei Wirkung in diesem System. Bei diesen Versuchen wurden die gleichen Effektoren ebenfalls mit den EGFR-positiven aber CD20-negativen A1207 (Dechant 2008) getestet (Abb. 51 B), um einen direkten Vergleich der Systeme zu ermöglichen. 225-IgA1 vermittelte zu $43,3 \pm 14,6$ % spezifische Lyse von A1207 mit PMN als Effektorzellen. 225-IgA2 induzierte mit $72,1 \pm 8,8$ % am effizientesten ADCC, gefolgt vom dimeren 225-IgA1 mit $56,8 \pm 8,4$ % Tumorzellyse, wobei der Unterschied zwischen IgA1 Monomer und Dimer nicht signifikant war. Im Gegensatz zu den EGFR-gerichteten IgA-Antikörpern vermittelte der 225-IgG1 nicht nur mit PMN, sondern auch mit MNC die Lyse der A1207-Zielzellen mit Lyseraten von $25,8 \pm 10,6$ % und $35,8 \pm 7,1$ % für PMN bzw. MNC als Effektoren. Damit konnte

gezeigt werden dass die CD20- bzw. EGFR-spezifischen Antikörper in ihrem System und damit antigenspezifisch die Lyse von Tumorzellen induzieren können.

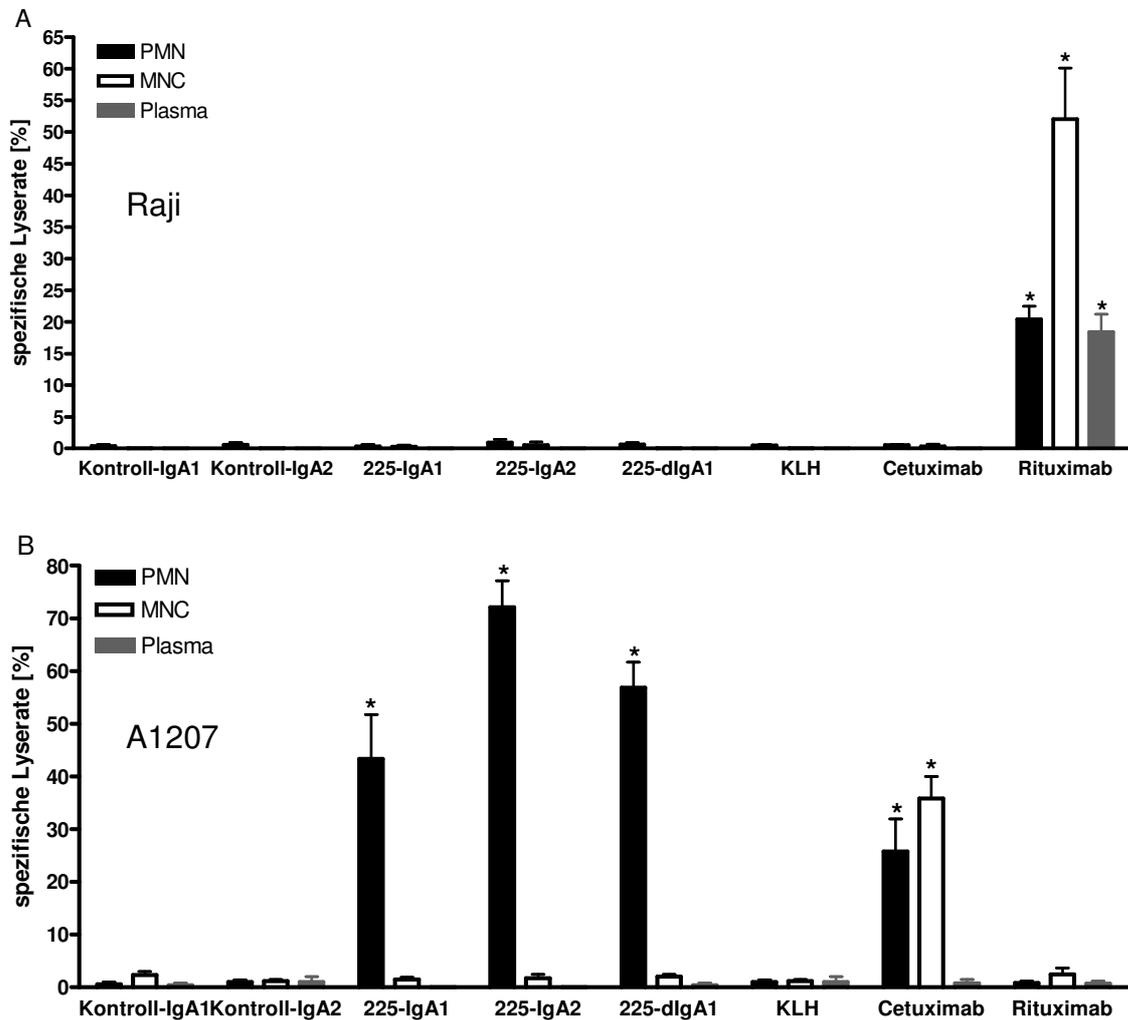


Abbildung 51: Kontrollelexperiment zum Nachweis der antigenspezifischen Lyse von Tumorzellen. (A) Rituximab als CD20-spezifischer Antikörper war in der Lage die Lyse von CD20-positiven Raji mit PMN, MNC und Plasma zu vermitteln. Dagegen zeigten alle EGFR-spezifischen Antikörper in diesem System keine Wirkung. (B) Rituximab war nicht in der Lage die Lyse von EGFR-positiven aber CD20-negativen A1207 zu vermitteln. Im Gegensatz dazu lieferten die EGFR-spezifischen Antikörper, 225-IgA1, 225-IgA2 und 225-dIgA1, mit PMN als Effektoren die Lyse der Zellen. Die 225-IgG1 Variante zeigte mit PMN und MNC eine Wirkung. Rituximab war in der Lage mittels der Rekrutierung von Plasma die Lyse von Raji Zellen zu vermitteln. Mit den EGFR-spezifischen Antikörpern war dies nicht möglich. Sterne indizieren signifikante Unterschied im Vergleich zum Kontroll-Antikörper (KLH, $p \leq 0,05$). Zu sehen sind Mittelwerte mit Standardabweichungen von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Zusammenfassend lieferten die vorangegangenen $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungstests als Ergebnis, dass die in dieser Arbeit rekombinant hergestellten monomeren und dimeren 225-IgA-Antikörper gegen den EGFR in der Lage waren, PMN zur Lyse von

Tumorzellen zu rekrutieren. Beim Vergleich der beiden Monomere war das 225-IgA2 in seiner Wirkung deutlich effektiver als 225-IgA1. Im direkten Vergleich zwischen monomerem und dimerem IgA1 zeigten sich Unterschiede, wenn niedrigere Effektorzell- zu Zielzell-Verhältnisse eingesetzt wurden. In diesen Fällen war das 225-IgA1-Dimer effektiver als das 225-IgA1-Monomer. Der vergleichbare 225-IgG1 lieferte in allen Versuchen die niedrigsten Lyseraten für einen EGFR-spezifischen Antikörper, besonders in den Versuchen mit unfraktioniertem Vollblut. Dagegen ließen sich alle Zielzellen mit IgA-Antikörpern und isolierten PMN, Monozyten und unfraktioniertem Vollblut lysieren. Darüber hinaus konnte auch die Spezifität der Antikörper nachgewiesen werden. Damit konnte im Rahmen dieser Arbeit die Funktionalität der rekombinant hergestellten EGFR-gerichteten IgA-Antikörper bezüglich der Induktion von ADCC nachgewiesen werden.

Da die Fähigkeit zur Komplementaktivierung und damit zur Induktion der Komplementabhängigen Zytotoxizität für IgA in der Literatur sehr kontrovers diskutiert wird (Russell 1989, Chintalacharuvu 1999, Zhang 2006, Dechant 2008, Lohse 2010), wurde dieser Aspekt im folgenden Abschnitt ausführlich untersucht.

3.3. Der Einfluss von EGFR-gerichteten IgA-Antikörpern auf die Komplementaktivierung

3.3.1. IgA-Antikörper aktivieren kein Komplement

IgG1-Antikörper aktivieren das Komplementsystem über den klassischen Weg (Brüggemann 1987). Allerdings konnte in einer früheren Studie bereits gezeigt werden, dass ein IgG1-Antikörper gegen den EGFR nicht ausreicht, um eine Komplement abhängige Zytotoxizität zu induzieren. Es waren zwei Antikörper vom humanen IgG1-Isotyp nötig, welche unterschiedliche nicht überlappende Epitope des EGFR erkennen müssen, um die Komplement-basierte Lyse von Tumorzellen zu vermitteln (Dechant 2007). In dieser Arbeit konnte diese Aussage verifiziert werden. In diesem Zusammenhang wurde getestet, ob die rekombinant hergestellten monomeren EGFR-Antikörper vom IgA1- und IgA2-Isotyp sowie das dimere EGFR-gerichtete IgA1-Molekül in der Lage wären, CDC zu vermitteln. Keines der angesprochenen Antikörper konnte das Komplementsystem zu aktivieren (Abb. 52). Nur die Kombination aus 225-IgG1, und h425, zwei IgG1-Antikörpern gegen unterschiedliche Epitope des EGFR, konnte CDC von A1207-Zellen induzieren.

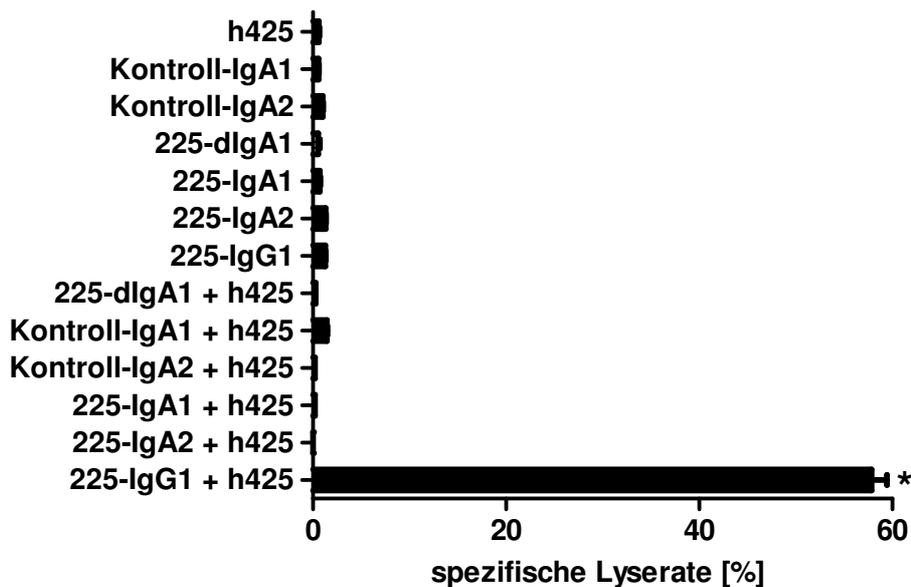


Abbildung 52: EGFR-Antikörper und die Rekrutierung des Komplementsystems zur Lyse von Tumorzellen. Durch ⁵¹Chrom-Freisetzungstests konnte festgestellt werden, dass eine Kombination von EGFR Antikörpern des IgG1-Isotyps die komplement abhängige Lyse von A1207-Glioblastomzellen vermitteln konnte. Im Gegensatz dazu führte eine Kombination von h425 mit 225-IgA1, 225-IgA2 und dimerem 225-IgA1 zu keiner Komplementaktivierung. Die Endkonzentration der Antikörper alleine oder in Kombination betrug 10 µg/ml. Die präsentierten Daten sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. (*) bedeutet signifikanter Unterschied ($p \leq 0,05$) zum Antikörper alleine.

3.3.2. EGFR-gerichtete IgA-Antikörper inhibieren die Komplementaktivierung

In nächsten Schritt wurde die Wirkung der EGFR-Antikörper vom IgA-Isotyp in Dreifachkombinationen untersucht, wobei zwei Antikörper dieser Kombination vom humanen IgG1-Isotyp waren. Als Voraussetzung für diese Untersuchungen musste untersucht werden, ob die rekombinant hergestellten IgA-Antikörper mit einem der Antikörper aus den Kombinationen kreuzreagieren, und damit überlappende Epitope erkennen. Innerhalb dieser direkten Immunfluoreszenzen zeigte sich, dass die verwendeten Antikörper 003 und 018, 005 und 425 und 225-IgG1, -IgA1 und -IgA2 sich nicht gegenseitig in ihrer Bindung an EGFR-exprimierende Zellen hindern (Abb. 53).

Charakterisierung rekombinanter IgA-Antikörper gegen den EGFR
- Ergebnisse -

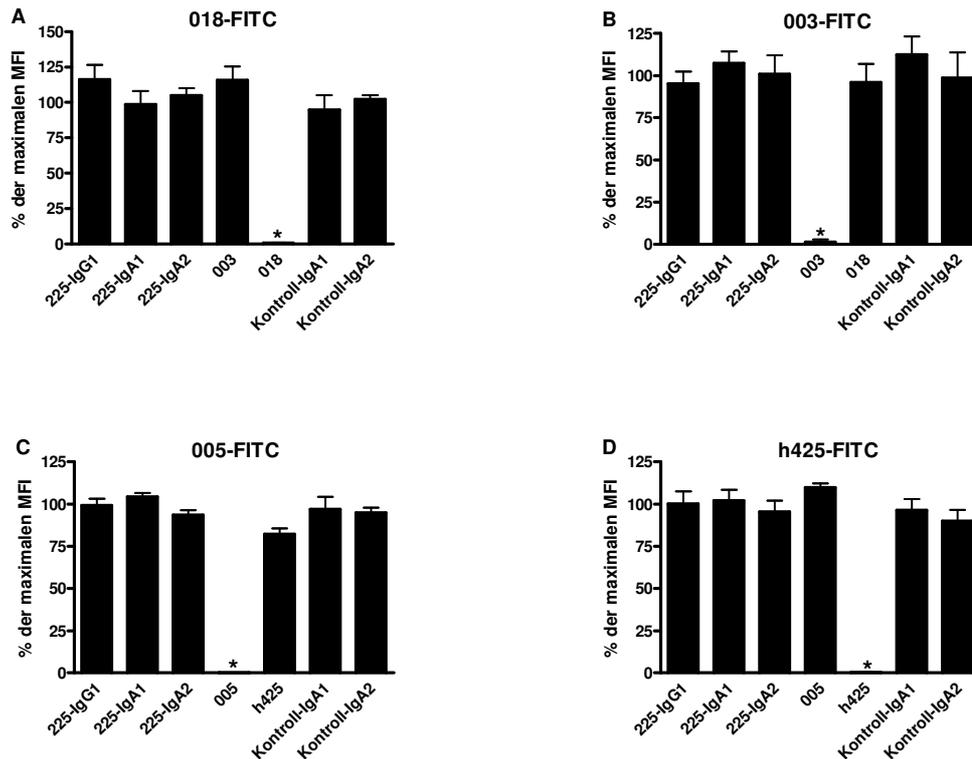


Abbildung 53: Die 225-IgA1- und 225-IgA2-Monomere erkennen unterschiedliche Epitope des EGFR im Vergleich zu den EGFR-IgG-Antikörper 003, 005, 018 und h425. Die einzelnen EGFR-Antikörper wurden mittels direkter Immunfluoreszenzen auf ihr Potential zur gegenseitigen Blockierung untersucht. Hierbei wurden A1207-Zellen mit einer geringen Konzentration eines FITC-markierten EGFR-Antikörpers und einem 200fachen Überschuss der anderen EGFR-Antikörper kokubiert. Unspezifische Antikörper zeigten in diesem Versuchsaufbau keinen Einfluss, somit war ein maximales Fluoreszenzsignal zu verzeichnen. Die hier dargestellten Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten zeigen, dass die Antikörper 018 (A), 003 (B), 005 (C) und h425 (D) Epitope des EGFR erkennen, welche sich vollständig von denen der Antikörper 225-IgG1 sowie 225-IgA1 und 225-IgA2 unterscheiden. Aus diesem Grunde wurden die sich nicht inhibierenden Antikörper 018 und 003 sowie 005 und h425 für die folgenden Kombinationsexperimente. Gezeigt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen von mindestens drei unabhängigen Experimenten gezeigt.

Aufgrund der Experimente konnten zwei verschiedene Kombinationen aus humanen EGFR IgG1-Antikörper zusammengestellt werden: 003 + 018 und 005 + h425, um in den folgenden Experimenten den Einfluss eines dritten Antikörpers, dem 225-IgG1, sowie beiden monomeren 225-IgA1 und -IgA2 und dem 225-IgA1-Dimer, zu untersuchen. Für diesen Zweck wurden zwei verschiedene Zielzellen, A431 und A1207, chromiert. Diese unterscheiden sich in ihrer Expression an komplement-regulatorischen Proteinen (CD46, CD55, CD59), da A431-Zellen deutlich höhere Expressionsraten zeigt als A1207-Zellen, insbesondere für CD59 ([Dechant 2008]).

Diese Zielzellen wurden inkubiert mit dem Serum gesunder Spender und den beiden Antikörperkombinationen 003/018 und 005/425 mit einer additiven Gesamtkonzentration von 10 µg/ml (Abb. 54). Diese Zweierkombinationen vermittelten Lyseraten von 24,6 ± 10,7% (A431) und 43,2 ± 8,7% (A1207) für die 003+018 Kombination bzw. 45,9 ± 4,9% (A431) und 51,0 ± 4,5% (A1207) für die zweite Kombination 005+h425. Zu diesen Kombinationen wurde im nächsten Schritt nun der dritten Antikörper hinzu titriert. In diesem System führte die Hinzugabe eines dritten humanen IgG1 zu einer weiteren Verstärkung der Komplement-abhängigen Lyse der Tumorzellen. Die Titration der 225-IgA1- und 225-IgA2-EGFR-Antikörper bewirkte einen gegenläufigen Effekt, da sie die Komplementaktivierung blockierten. Die stärkste inhibitorische Wirkung vermittelte das 225-IgA2-Monomer. Alle drei IgA-Varianten des 225-IgG1-Antikörpers sind somit in der Lage, die Komplementaktivierung zu hemmen.

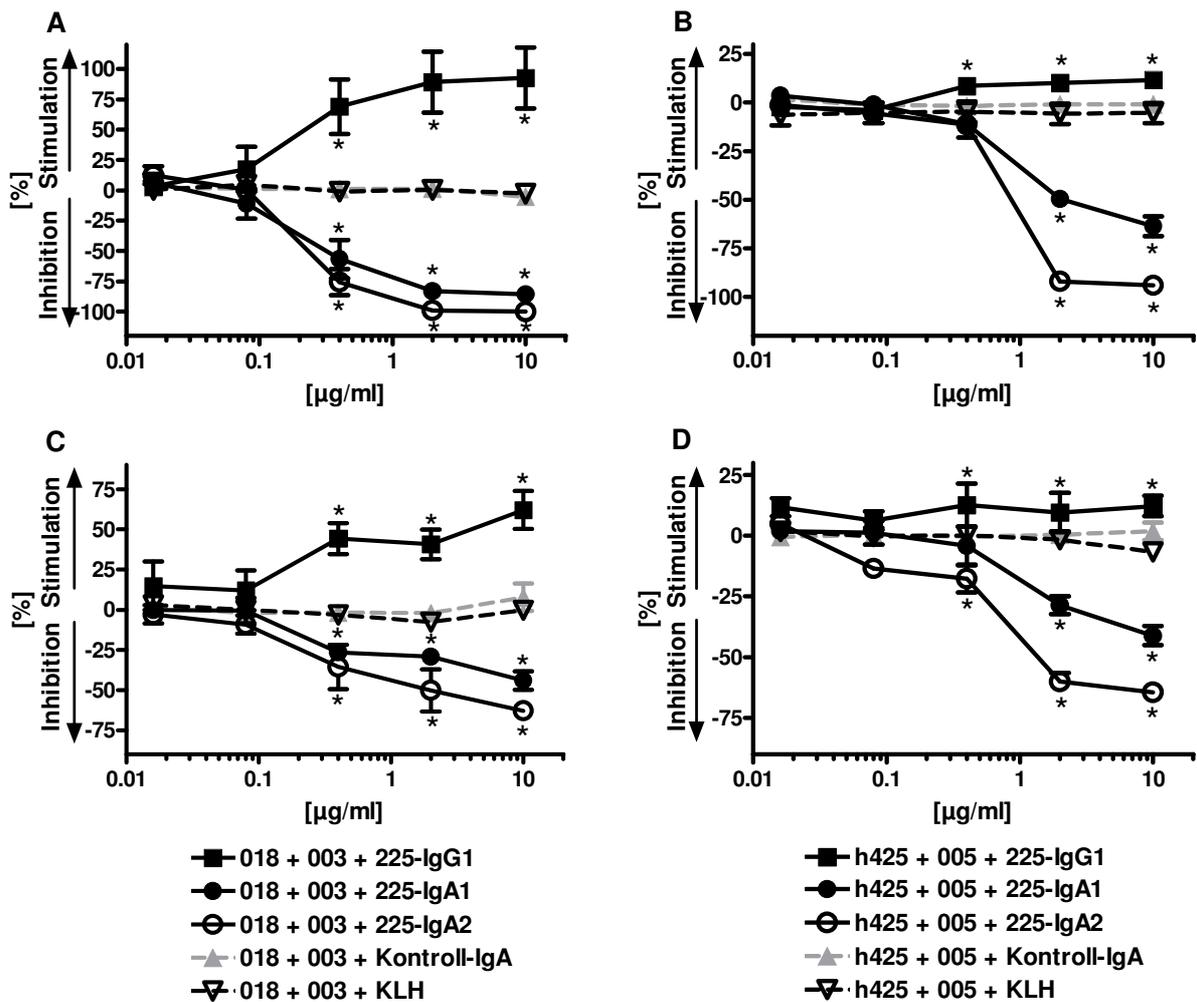


Abbildung 54: Die beiden Immunglobulin-Isotypen IgG und IgA haben einen unterschiedlichen Einfluss auf die Komplementaktivierung einer Zweierkombination von EGFR-IgG1-Antikörpern.

Auf zwei verschiedenen Zielzellen, den A431 (A, B) und A1207 (C, D), konnte im Rahmen eines ⁵¹Chrom-Freisetzungstests gezeigt werden, dass die beiden Isotypen unterschiedliche Wirkungen zeigten. Zu einer Konzentration von 10 µg/ml der beiden kombinierten IgG1-Antikörper 003 und 018 (A, C) sowie 005 und h425 (B, D) wurde der dritte Antikörper mit steigender Konzentration hinzu titriert. Nach der Berechnung der Inhibition/Stimulation [%] konnte gezeigt werden, dass bei beiden Zelllinien und Kombinationen eine signifikante Stimulation der CDC durch den 225-IgG1 induziert wurde. Im Kontrast dazu wurde durch die beiden EGFR-gerichteten IgA-Antikörper eine signifikante Verminderung, im Falle des 225-IgA1, und zu einer fast vollständigen Inhibition im Falle des 225-IgA2 erreicht. Unspezifische Antikörper wie KLH (humaner IgG1) und humane IgA1- und IgA2-Kontroll-Antikörper beeinflussten die Komplementaktivierung nicht. Als signifikant galten Ergebnisse bei $p \leq 0,05$, im Vergleich zum unspezifischen Kontrollantikörper (KLH). Gezeigt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen von mindestens vier unabhängigen Experimenten.

3.3.3. Spezifität der beobachteten Effekte

Zunächst wurde die Beteiligung des Komplementsystems an den beobachteten Lyseraten verifiziert. Die Hitzeinaktivierung des Serums bei 56°C für 30 Minuten resultierte in einer vollständigen Inaktivierung des Komplementsystems. Unter diesen Bedingungen konnte keine CDC vermittelt werden (Abb. 55 A).

Die Spezifität der EGFR-Antikörper wurde in einem anderen Antigen-System untersucht. Rituximab war ein wirksamer Antikörper um die Lyse von CD20-positiven Raji-B-Lymphom-Zellen zu induzieren. Eine Zugabe von EGFR-spezifischen oder -unspezifischen Antikörpern hatte in diesem System keine Auswirkung auf die Effektivität von Rituximab (Abb. 55 B).

Um die nachgewiesene Blockade der CDC durch die EGFR-gerichteten IgA-Antikörper als für diese spezifisch zu bestimmen, wurde die Wirkung weiterer EGFR-Antikörperkonstrukte getestet (Abb. 55 C und D). Zu diesen zählte zunächst der murine 225-IgG1, welche nicht in der Lage war, das humane Komplementsystem zu rekrutieren. Ebenso ein scFV-Fc (single-chain Fragment variable-Fragment constant, im Folgenden 225-Fc) Konstrukt bestehend aus einer einfachen variablen Domäne gegen den EGFR und einer fusionierten IgG1 Fc-Domäne. Aufgrund dieser sollte dieses Konstrukt in der Lage sein, über die Bindung des Komplementproteins C1q den klassischen Weg zu aktivieren. Allerdings konnte keine weitere Verstärkung der Komplementaktivierung beobachtet werden. Auf der anderen Seite induzierte eine mutierte Variante dieses Fusionsproteins (225-Fc (-/-)) mit einer reduzierten C1q-Bindekapazität ebenso eine Blockade der spezifischen Lyserate wie das monomere

225-IgA2. Die einzelnen Konstrukte hemmten die Komplementaktivierung unterschiedlich stark. Der murine 225-IgG1 sowie das 225-scFc Fusionsprotein weder stimulierten noch blockierten die Komplementaktivierung. Das Monomer des 225-IgA1 blockierte den CDC zu 50% und 225-Fc (-/-) und 225-IgA2 hemmten den CDC fast vollständig.

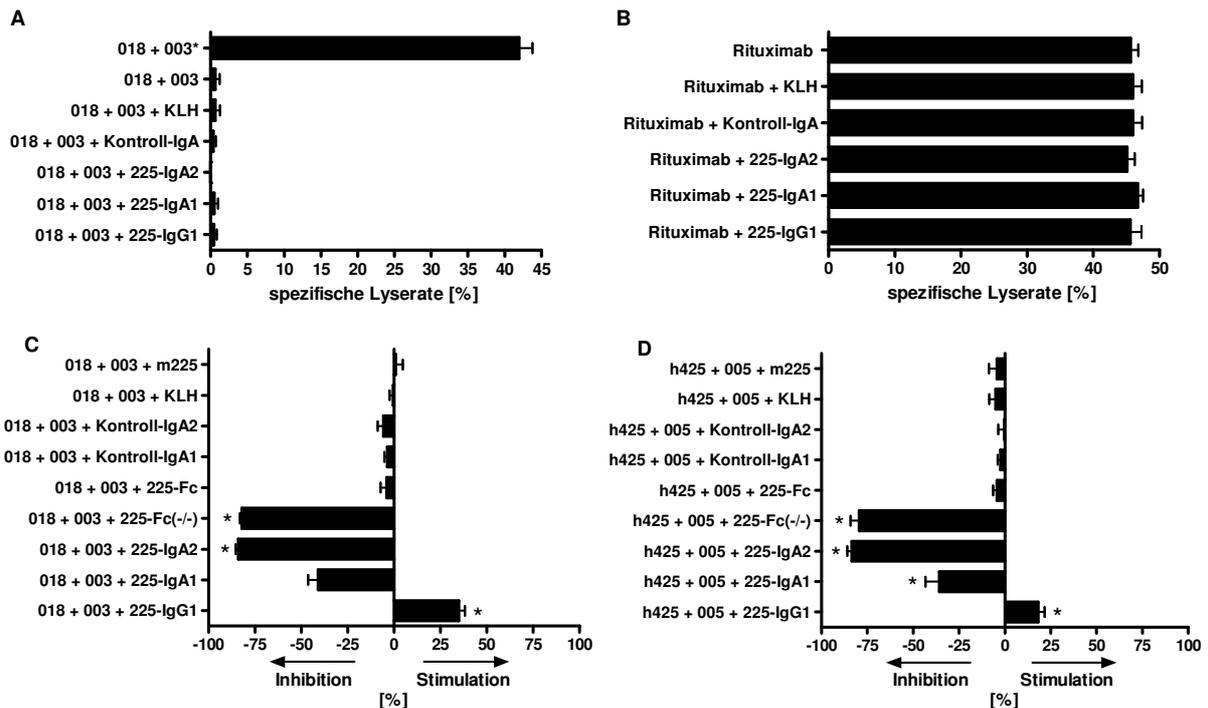


Abbildung 55: Die EGFR-gerichteten IgA-Antikörper vermittelten eine antigen- aber nicht IgA-spezifische Inhibition der Komplementaktivierung. Zunächst konnte durch Hitzeinaktivierung (A) des Serums (56°C und 30 Minuten) gezeigt werden, dass die Lyse von Tumorzellen durch die Hitzebehandlung des Serums verhindert werden konnte. (B). Rituximab ist ein wirksamer Antikörper, um CDC von EGFR-negativen CD20-exprimierenden Raji-Zellen zu induzieren. Die Hinzugabe eines weiteren Antikörpers, EGFR-spezifisch oder -unspezifisch, hatte keinen Einfluss. Für den Nachweis, dass die Inhibition der Komplementaktivierung spezifisch für die IgA-Variante ist, wurde die Wirkung weiterer Konstrukte (C und D) untersucht. Bei diesen Konstrukten handelte es um den murinen 225-IgG1 (m225), sowie zwei scFv-Fc Konstrukte, von denen eine über die native IgG1-Fc-Domäne verfügt (225-scFv-Fc) und die andere durch Mutation ihre C1q-Bindekapazität verlor (225 scFv-Fc (-/-)). Zusammenfassend konnte mit diesem Experimenten gezeigt werden, dass die inhibitorischen Wirkungen der beiden IgA-Antikörper nicht spezifisch für den IgA-Isotyp waren. Die Daten sind Durchschnittswerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Signifikanzen ($p \leq 0,05$) im Vergleich zum Kontroll-Antikörper (KLH) wurden mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

3.3.4. EGFR-gerichtete IgA-Antikörper beeinflussen die Opsonisierung und C1q-Deposition

Zunächst wurde untersucht, ob die EGFR-gerichteten IgA-Antikörper die Opsonisierung der Zielzellen reduzieren. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die Reduktion der Komplementaktivierung. Aus diesem Grund wurden A431-Tumorzellen mit den verschiedenen Antikörperkombinationen inkubiert und im Anschluss deren Bindung durch einen FITC-markierten gegen die humane κ -Leichtkette gerichteten Sekundärantikörper nachgewiesen (Abb. 56 A und B). Es konnte beobachtet werden, dass sowohl EGFR-IgG- wie auch IgA-Antikörper die Opsonisierung der Tumorzellen verstärkten. Somit stellt die Reduktion der Opsonisierung der Zielzellen nicht die Ursache für die Hemmung der Komplementaktivierung.

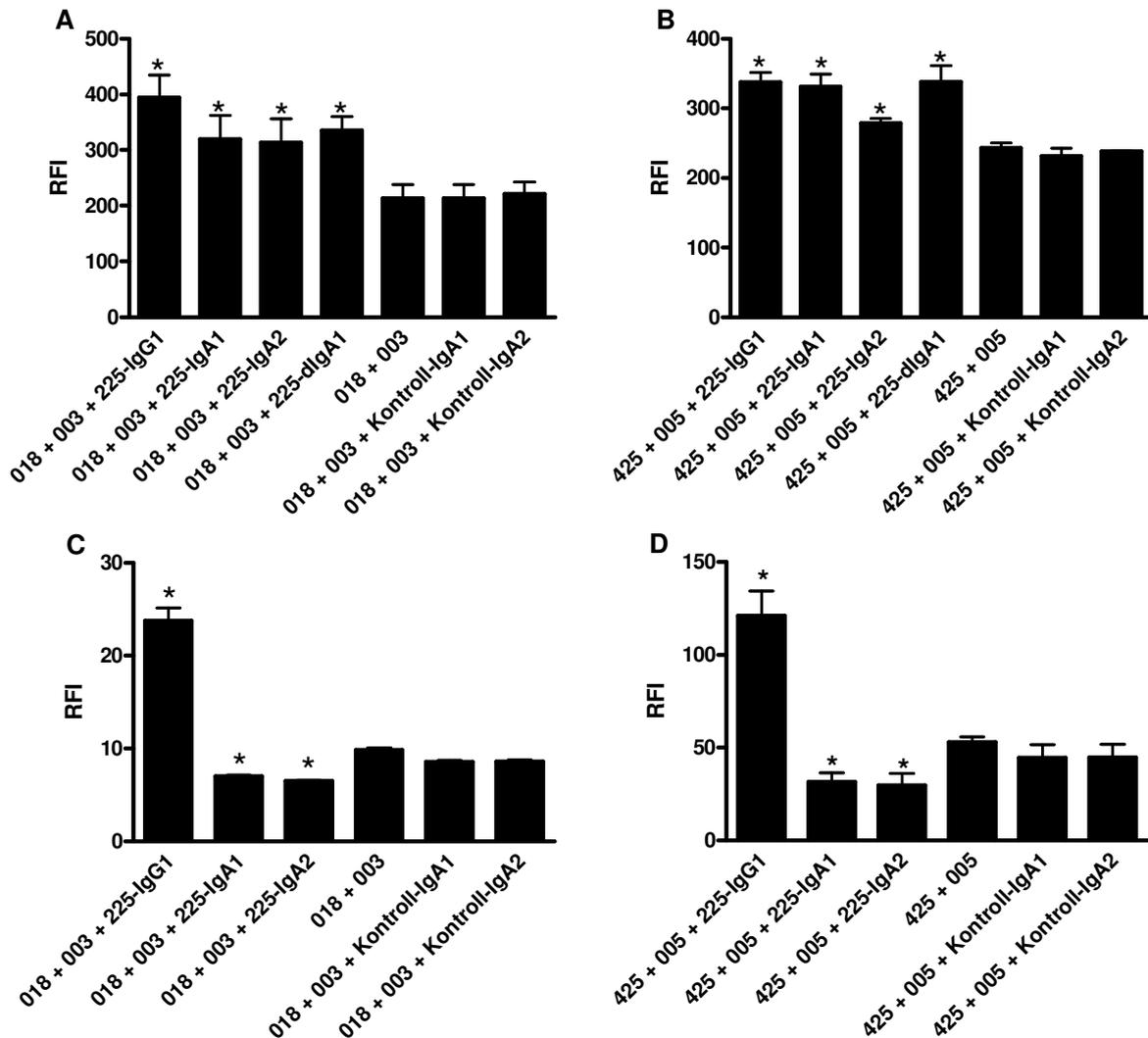


Abbildung 56: Sowohl 225-IgG1- als auch 225-IgA-Antikörper verstärken die Opsonisierung von Tumorzellen, aber nur der 225-IgG1 verstärkte die Opsonisierung mit C1q. Bei beiden Kombinationen 018+003 (A) und 005+425 (B) führt die Addition eines weiteren EGFR-spezifischen Antikörpers vom IgG- oder IgA- Isotyp zu einer verstärkten Opsonisierung der Zielzellen (A431). Bei dieser indirekten Immunfluoreszenz betrug die finale Konzentration der kombinierten Antikörper 10 µg/ml, und deren Bindung wurde mit einem anti-human-kappa-leichte Kette-spezifischen Sekundärantikörper nachgewiesen. Ebenso konnte im Rahmen direkter Immunfluoreszenzen für beiden Kombinationen gezeigt werden, dass ein zusätzlicher IgG1-Antikörper die C1q-Deposition weiter verstärkt, wogegen IgA-Antikörper diese signifikant reduzieren. Analysiert wurde hier Bindung von C1q an A431-Tumorzellen mittels eines FITC-markierten C1q-Antikörpers. Die gezeigten Resultate sind die Durchschnittswerte mit Standardabweichungen aus drei (B), vier (A, C) und fünf (D) unabhängigen Experimenten. Signifikanzen ($p \leq 0,05$) im Vergleich zur Zweifachkombination (003+018, 005+425) wurden mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

Im Folgenden wurde untersucht, ob die EGFR IgA Antikörper die Deposition von Komplementproteinen auf den Tumorzellen negativ beeinflussen (Abb. 56 C und D). Im Rahmen dieser direkten Immunfluoreszenzen konnte nachgewiesen werden, dass die Zugabe von EGFR-gerichteten IgA-Antikörpern als dritter EGFR-spezifischer Antikörper zu einer verminderten Rekrutierung des Komplementfaktors C1q führte. Während ein dritter humaner IgG1, in diesem Fall der 225-IgG1, in beiden Kombinationen in einer deutlich verstärkten Deposition von C1q resultierte, führte die Komplementierung von IgA-Antikörpern in einer signifikanten Reduktion der C1q-Deposition. Als Ergebnis dieser direkten und indirekten Immunfluoreszenzen lässt sich festhalten, dass IgA-Antikörper die Aktivierung des Komplementsystems störten, indem sie offenbar die Rekrutierung der Komplementfaktoren verminderten bzw. verhinderten, welche für die Initiation der Komplementkaskaden verantwortlich sind.

3.3.5. Komplementinhibition durch dimeres 225-IgA1

Neben den beiden monomeren 225-IgA1 und 225-IgA2 wurde auch die Wirkung des dimeren 225-IgA1 auf die Komplementaktivierung getestet. Im Rahmen von ⁵¹Chrom-Freisetzungstests konnte gezeigt werden, dass auch dimeres 225-IgA1 nicht in der Lage war, weder alleine noch in Kombination mit einem IgG1-Antikörper, eine komplement abhängige Lyse der Zielzellen, A431, zu induzieren (Abb. 57).

Charakterisierung rekombinanter IgA-Antikörper gegen den EGFR
- Ergebnisse -

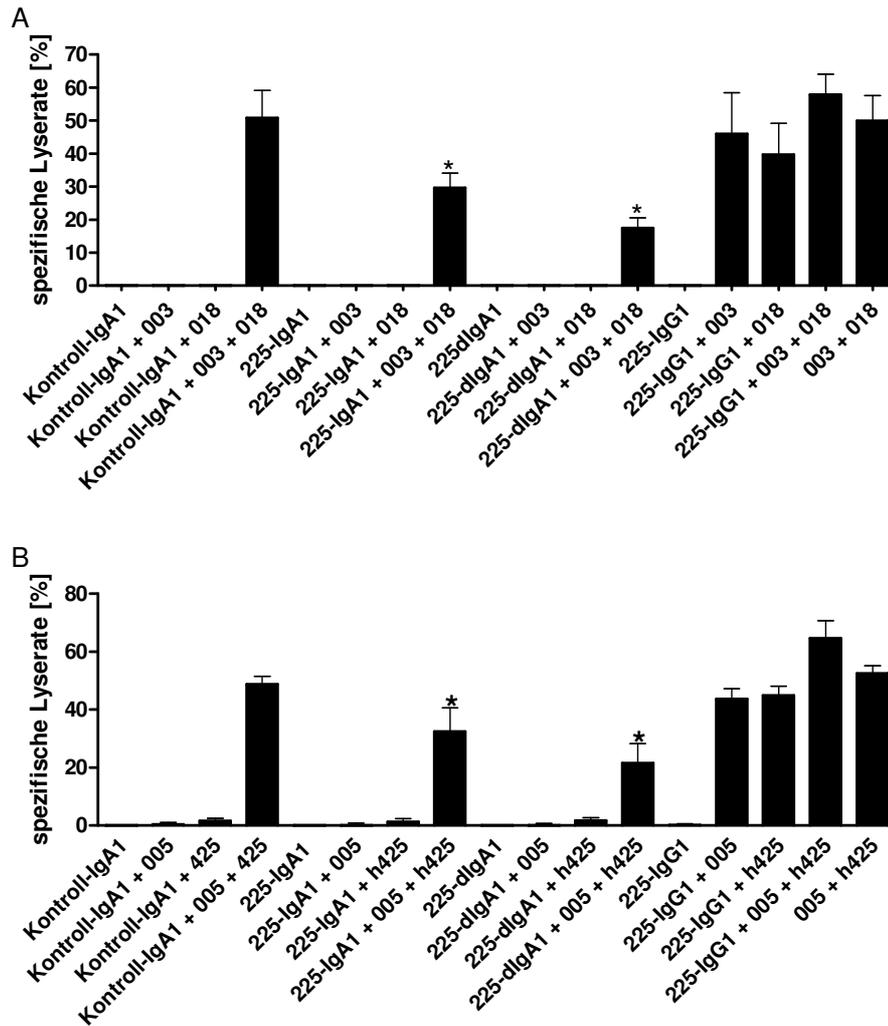


Abbildung 57: Im direkten Vergleich zeigen monomeres 225-IgA1 und dimeres 225-IgA1 eine unterschiedliche Effektivität bei der Inhibition der Komplementaktivierung. Während beide 225-IgA1-Varianten weder alleine noch in Kombinationen mit einem EGFR-spezifischen IgG1-Antikörper (018, 003, 005, h425) in der Lage waren, das Komplementsystem für die Lyse von A431-Tumorzellen zu rekrutieren, zeigte sich in Kombination mit zwei IgG1-Antikörper (018 + 003 in A und 005 + h425 in B), dass dimeres 225-dIgA1 die Komplementaktivierung stärker inhibieren kann als das vergleichbare Monomer. Im Gegensatz dazu konnte in diesem Versuchsaufbau gezeigt werden, dass der vergleichbare 225-IgG1 in beiden Kombinationen die Komplementaktivierung weiter verstärkte. Die gezeigten Resultate sind die Durchschnittswerte aus drei unabhängigen Experimenten. Signifikanzen ($p \leq 0,05$) im Vergleich zu Kontroll-IgA1 wurden mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

Die Daten zeigten, dass dimeres 225-IgA1 stärker wie das monomeres 225-IgA1 die Stimulation der CDC durch zwei nichtkreuzblockierende EGFR-IgG1-Antikörper (018 + 003 und 005 + h425) inhibierte. Somit konnte gezeigt werden, dass neben monomerem 225-IgA1 auch das dimere 225-IgA1 nicht in der Lage war, CDC von Tumorzellen zu bewirken.

4. Diskussion

4.1. Rekombinante Herstellung der EGFR-gerichteten IgA-Antikörper

Im Vorfeld dieser Arbeit wurde für die rekombinante Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten monomeren EGFR-gerichteten IgA-Antikörper das Expressionssystem etabliert (Dechant 2007, Beyer 2009). Die Verwendung von CHO-Zellen und den GS-Vektoren als Expressionssystem erwies sich bereits bei der Produktion anderer therapeutischer Antikörper als erfolgreich (Chu und Robinson 2001, Browne und Al-Rubeai 2007). Für die Herstellung von dimerem IgA wurde eine gut produzierende IgA-Transfektante mit einem Vektor transfiziert, welcher eine Expressionskassette für die humane J-Kette enthielt. Über die Selektion mit Puromycin konnte ein gut produzierender Einzelklon generiert werden. Dieses Verfahren ist in ähnlicher Weise bereits in der Literatur beschrieben (Johansen 1999, Favre 2003, Mantis 2007). Im Unterschied zu diesen Publikationen war in dieser Arbeit eine Penta-Histidin-Markierung an den C-Terminus der J-Kette fusioniert. Durch den Nachweis dieser Markierung mittels Immunblot und -fluoreszenzen war es möglich, den Einbau der J-Kette in das dimere 225-IgA1 zu überprüfen, insbesondere da keine verwendbaren Antikörper gegen die J-Kette verfügbar sind. Auf diese Weise konnte dimeres IgA mit inkorporierter J-Kette produziert werden.

Ein weiterer Unterschied zu den publizierten Verfahren war die Adaption der Transfektanden an serumfreie Suspensionskulturbedingungen. Die Verwendung von chemisch definiertem serumfreiem Medium reduziert das Risiko von übertragbaren Infektionskrankheiten und einer Immunogenität der Präparation durch die Vermeidung von bovinen Serumproteinen. Damit wurde eine wichtige Voraussetzung hinsichtlich der Produktion eines therapeutischen Antikörpers geschaffen.

4.2. Etablierung eines geeigneten Produktionssystems

Im nächsten Schritt war es nun erforderlich ein Produktionssystem zu etablieren, mit dem die einzelnen IgA-Konstrukte in ausreichenden Mengen produziert werden konnten. Dafür wurden im Rahmen dieser Arbeit drei verschiedenen Systeme im Hinblick auf Handlichkeit, Zellwachstum und Produktivität getestet: Hybridomkulturflaschen (Greiner bio one), Miniperm Bioreaktoren (Millipore) und das Celine CL1000 Produktionssystem (Sartorius). Die Hybridomkulturflaschen waren einfach zu handhaben, aber aufgrund der niedrigen Wachstums- und Produktionsraten musste

eine Vielzahl von Flaschen gleichzeitig kultiviert werden, um ausreichend Antikörper produzieren zu können. Damit stellten die Kulturflaschen ein sehr ineffizientes System für die Produktion der IgA-Antikörper dar. Eine deutliche Verbesserung ermöglichte die Einführung der Rollerflaschen von Millipore. Zwar verringerte sich in diesen Bioreaktoren die spezifische Produktionsrate (SPR) um über die Hälfte, verglichen mit der SPR in den Hybridomkulturflaschen. Dennoch konnten wegen der hohen Wachstumsraten die Ausbeuten um den Faktor 10 gesteigert werden. Die Reduktion der Produktionskapazität auf eine Flasche pro Konstrukt vereinfachte zudem die Handhabung. Trotz allem erwiesen sich diese Produktionsflaschen als anfällig für Probleme. Zum einen neigten die Flaschen dazu, an den Verschlussstellen undicht zu werden, wodurch sich die Haltbarkeit zum Teil auf unter einen Monat reduzierte. Zum anderen waren die Flaschen nicht auswaschbar, so dass sich Zellüberreste und –aggregate im Reaktor ansammelten. Aus diesen Gründen wurde als alternatives System, das Celine CL1000 Produktionssystem, eingeführt (Favre 2003). Diese Flaschen waren ähnlich wie die Hybridomkulturflaschen leicht zu handhaben und darüber hinaus konnten die Wachstumsraten, die SPR als auch die Gesamtausbeuten deutlich gesteigert werden. Durch die Kultivierung in diesen Bioreaktoren steigerten die CHO-Zellen ihre Wachstumsraten auf 1000 %/d und ihre SPR auf Maximalwerte von 2 µg/d/Zelle. Damit kristallisierte sich das CL1000 System als das beste System für die Produktion von rekombinanten IgA-Antikörpern heraus. Eine vergleichbare Produktion unter chemisch definierten serumfreien Bedingungen, mit ähnlich hohen Ausbeuten von rekombinantem IgA, insbesondere von dimerem IgA ist in der Literatur bislang nicht beschrieben. Des Weiteren eröffnet sich infolgedessen die Möglichkeit durch Aufskalierungen eine industrielle Produktion zu realisieren.

4.3. Optimierung einer Aufreinigungsstrategie für dimeres IgA

Antikörper vom IgA-Isotyp können nicht wie IgG-Antikörper über eine Protein A-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Daher bedarf es alternativer Strategien, um dieses Ziel zu erreichen. Die bisherigen Ansätze beinhalteten die Aufreinigung mittels Ammoniumsulfat-Präzipitation (Perosa 1990), thiophiler Agarose (Belew 1987, Leibl 1995) oder waren antigen- oder isotypspezifisch (Gregory 1987, Nilson 1993, Morton 1993, Lindahl 1990, Stenberg 1994, Thern 1995, Areshoug 2002). Die Nachteile dieser Ansätze bestehen in einer unzureichenden Reinheit,

hohen Verlusten und in der Beschränkung auf ein Antigen bzw. einen Isotyp. Damit war es nötig eine Aufreinigungsstrategie zu entwickeln, die universell anwendbar war, nur geringfügige Verluste verursachte und gleichzeitig eine hohe Reinheit garantieren konnte. Die Verwendung der ahukappa-Matrix im Rahmen einer Affinitätschromatographie vereinte diese Punkte auf sich (Beyer 2009). Im Zuge dieser Arbeit konnte die Aufreinigungsstrategie weiter optimiert werden, so dass die IgA-Antikörper nun direkt aus dem Überstand mittels der ahukappa-Affinitätschromatographie isoliert werden konnten. In einem zweiten Schritt wurde mit einer Größenausschlusschromatographie hochreines monomeres IgA präpariert. Damit war für monomeres IgA eine erfolgreiche Aufreinigungsstrategie etabliert.

Im Gegensatz zu monomerem IgA gibt es für dimeres IgA nur wenige Arbeiten, bei denen rekombinant hergestelltes dimeres IgA aufreingt wurde. In diesen Studien erfolgte dies über die Antigenspezifität (Johansen 1999) oder über eine Gelfiltration (Favre 2003, Mantis 2007). Mit diesen Methoden war es entweder nicht möglich das Antigen zu wechseln oder zu garantieren, dass die aufgereinigten Dimere auch die J-Kette enthielten. In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal eine Strategie entwickelt, mit der es möglich war, unabhängig vom Antigen spezifisch dimeres IgA mit inkorporierter J-Kette herzustellen. Durch die C-terminale Fusion der Penta-Histidin-Markierung konnten über eine IMAC speziell die polymeren IgA-Formate isoliert werden, die auch über eine J-Kette verfügten. Durch die ahukappa-Affinitätschromatographie, IMAC und Gelfiltration konnte hochreines dimeres IgA mit inkorporierter J-Kette isoliert werden.

Die Qualität der Aufreinigung von monomerem und dimerem IgA wurde durch gelelektrophoretische Auftrennung und Färbung der Proteine mit Coomassie (native Bedingungen), Silbernitrat (denaturierende Bedingungen) und durch die Kapillargelelektrophorese (Experion) überprüft. Ebenso konnte mittels Western Blot und durch indirekte Immunfluoreszenzen gezeigt werden, dass hochreines monomeres 225-IgA1 und 225-IgA2 bzw. dimeres 225-IgA1 mit inkorporierter J-Kette vorlagen. Dabei war die C-terminale Fusion der Penta-Histidin-Markierung von Vorteil, da mittels dieser die Inkorporation der J-Kette nachverfolgt werden konnte. Dahingehend war die Fusion dieser Markierung notwendig, da bisher keine geeigneten Antikörper zur Detektion der J-Kette verfügbar sind. In dieser Arbeit wurde somit für monomeres und insbesondere für dimeres IgA eine geeignete Aufreinigungsstrategie etabliert.

4.4. Funktionelle Eigenschaften der EGFR-gerichteten IgA-Antikörper

Ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war die funktionelle Charakterisierung der rekombinant hergestellten IgA-Antikörper. Dabei sollten diese sowohl mit einem 225-IgG1-Antikörper verglichen werden als auch Unterschiede zwischen den IgA-Isotypen untersucht werden.

Ein Ergebnis dieser funktionellen Charakterisierung war, dass IgA-Antikörper direkte Wirkmechanismen, z.B. die Inhibition des Tumorzellwachstums, induzieren konnten. Dabei wurden zum Teil signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Isotypen festgestellt, obwohl für die Antikörper im Rahmen einer indirekten Immunfluoreszenz kein signifikanter Unterschied bezüglich ihrer Affinität zum Antigen nachgewiesen werden konnte. Das Ergebnis der Zellviabilitätstest zeigte aber, dass beide 225-IgA-Monomere das Tumorzellwachstum weniger inhibierten als ein vergleichbarer 225-IgG1 und darüber hinaus der 225-IgA1 das Tumorzellwachstum effektiver verhinderte als dessen 225-IgA2-Variante. Dies ließe sich durch die Unterschiede in der Gelenkregion der einzelnen Isotypen erklären (Furtado 2004). In diesem Punkt unterscheiden sich die Isotypen IgA und IgG voneinander, da letzterer über eine höhere Flexibilität in der Gelenkregion verfügt. Auch zwischen den beiden IgA-Isotypen IgA1 und IgA2 gibt es diesbezüglich Unterschiede. Im Falle des IgA1 bewirkt die Extension der Gelenkregion um 13 Aminosäuren einen deutlichen Zugewinn an Flexibilität gegenüber dem IgA2. Antikörper vom IgA1-Isotyp können flexibel zwischen T- und Y-Konformationen wechseln und erkennen daher eher flexible Proteinstrukturen. IgA2-Antikörper nehmen aufgrund der starren Gelenkregion eine kompakte T-förmige Struktur ein und binden eher starre und repetitive Antigene (Furtado 2004, Woof 2006).

Ein weiteres Ergebnis dieser funktionellen Charakterisierung war, dass die rekombinanten IgA-Antikörper indirekte Wirkmechanismen, z.B. antikörper-abhängige Effektorzell-vermittelte Tumorzelllyse (ADCC), induzieren konnten. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass IgA-Antikörper Granulozyten effektiver und Monozyten ähnlich effektiv wie IgG1-Antikörper rekrutieren konnten, um ADCC zu induzieren. Damit waren 225-IgA-Antikörper in der Lage zwei Effektorzellpopulationen zu rekrutieren, die eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung von gewebeständigen Tumoren haben könnten (Keler 2000, van Egmond 2008, Clark 2010). In der Tat gewinnen Granulozyten nicht nur eine zunehmende Bedeutung als Spielmacher in der angeborenen Immunabwehr bei mikrobiellen

Infektionen, sondern auch aufgrund ihres antitumoralen Potentials, besonders in der Prevention von Rezidiven (Challacombe 2006). In einer aktuellen Studie konnte das Überleben von Ratten deutlich verbessert und die Rückbildung von soliden Tumoren durch Applikation von Granulozyten erreicht werden (Jaganjac 2010). Darüber hinaus können neutrophile Granulozyten der frühen Tumorentwicklung entgegenwirken (Zivkovic 2005). Dies bedeutet, dass Granulozyten eine antitumorale Wirkung haben können. Zusätzlich sezernieren aktivierte Granulozyten Mediatoren, die weitere Effektorzellen chemotaktisch anlocken und die Diapedese dieser Zellen erleichtern (van Egmond 2008). Durch monoklonale Antikörper, wie die EGFR-gerichteten IgA-Antikörper aus dieser Arbeit, könnte das zytolytische Potential der Granulozyten gegen solide EGFR-überexprimierende Tumoren gerichtet werden.

IgA-Antikörper sind sehr effizient darin, über den Fc-Rezeptor Fc α RI Granulozyten und Kupffer-Zellen zu aktivieren, um damit deren zytolytische oder phagozytäre Reaktionen zu bewirken (Weisbart 1988, Monteiro 1990, Valerius 1997, Deo 1998, van Egmond 2000, Dechant 2008, Beyer 2009). Des Weiteren unterscheiden sich IgA-Antikörper von IgG-Antikörpern in der Interaktion mit Fc-Rezeptoren (Woof 2004 und 2006, Dechant 2002 und 2008). Dabei interagieren zwei Fc α -Rezeptoren in einer 2:1 Stöchiometrie mit einem IgA-Monomer. Darüber hinaus liegt die Interaktionsfläche der D1-Domäne des Fc α -Rezeptors in der Interface-Region zwischen der C α 2- und der C α 3-Region. Damit befindet sich diese näher am C-Terminus als die Interaktionsfläche zwischen Fc γ -Rezeptoren und IgG-Antikörpern. Hier tritt die D2-Domäne des Rezeptors mit der oberen Cy2-Domäne und der unteren Gelenkregion in Wechselwirkung. Durch diese Interaktion mit dem Rezeptor müssen IgG-Antikörper eine abgeknickte Konformation einnehmen (Abb. 58, Woof 2004). Möglicherweise erklärt dies die effizientere Aktivierung von Granulozyten durch EGFR-gerichtete IgA-Antikörper. Eine weitere Begründung dafür, dass die 225-IgA-Antikörper im Vergleich zu IgG-Antikörpern wirksamer waren in der Induktion von ADCC, könnte in der besonders effizienten Interaktion von Fc α RI und FcR γ -Kette liegen (Morton 1995, Bakema 2006).

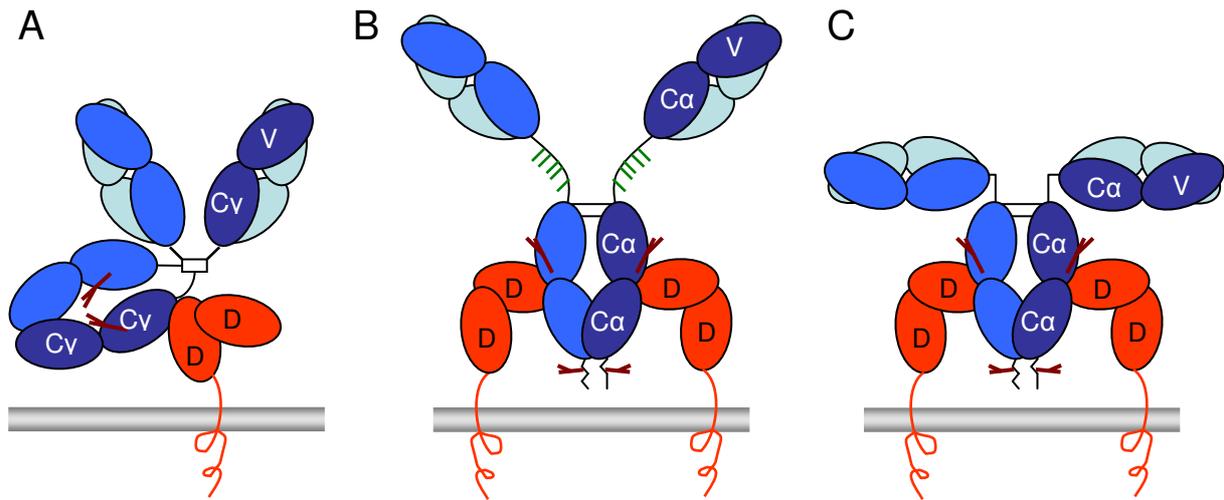


Abb. 58: IgG- und IgA-Antikörper binden unterschiedlich an Fc-Rezeptoren. (A) IgG1-Antikörper müssen eine abgeknickte Konformation einnehmen, um mit Fc γ -Rezeptoren zu interagieren, da sich die Interaktionsfläche an der oberen C γ 2-Domäne und der unteren Gelenkregion befindet. Antikörper der IgA1- (A) und IgA2- (B) Isotypen werden von Fc α RI in einer 2:1 Stöchiometrie gebunden. Da die Interaktionsfläche zwischen den C α 2- und der C α 3-Domänen liegt, müssen IgA-Antikörper keine Konformationsänderung durchlaufen, um mit dem Rezeptor zu interagieren. IgA2- Antikörper (C) reduzieren durch die verkürzte Gelenkregion und die starre T-förmige Konformation den Abstand zwischen Effektorzelle und Zielzelle in der immunologischen Synapse. Dagegen wird bei IgA1-Antikörpern (B) der Abstand durch die verlängerte Gelenkregion vergrößert. (Woof 2004 verändert)

Innerhalb der ADCC-Versuchsreihen war der 225-IgA2 stets das effektivere Antikörperkonstrukt als der 225-IgA1. Möglicherweise begünstigt die starre T-förmige Konformation des IgA2 eine stabilere Verknüpfung zwischen Effektorzelle und Zielzelle in der immunologischen Synapse (Furtado 2004). Eine ähnliche Beobachtung konnte zwischen IgG1- und IgG3-Antikörpern gemacht werden (Walker 1989). Die Extension in der Gelenkregion der IgG3-Antikörper bewirkte ebenfalls einen Unterschied in der Funktionalität, wodurch IgG3-Antikörper weniger effektiv ADCC vermitteln als IgG1-Antikörper (Bruggemann 1987).

Im Falle von Granulozyten haben IgA-Antikörper eine höhere Affinität zu Fc α RI als IgG-Antikörper zu Fc γ -Rezeptoren (Woof 2004) und würden so die Granulozyten stärker aktivieren (Woof 2006). Dieser Effekt könnte aufgehoben werden, indem Granulozyten z.B. durch den Granulozyten-Koloniestimulierenden-Faktor (G-CSF) oder Interferon- γ (IFN γ) aktiviert und dadurch den hochaffinen IgG-Fc-Rezeptor Fc γ RI exprimieren würden (Wallace 1994). Der Effekt, dass die Expression des Fc γ RI höhere Lyseraten bei ADCC vermitteln kann, ließ sich im Rahmen der ⁵¹Chrom-Freisetzungstests mit unstimulierten Monozyten beobachten. Die isolierten

Monozyten exprimierten neben dem niedrigaffinen FcγRII auch den hochaffinen FcγRI. Dadurch konnten IgG1-Antikörper ähnlich effektiv wie EGFR-gerichtete IgA-Antikörper Monozyten rekrutieren, um ADCC von Tumorzellen zu vermitteln. In der Literatur wird eine Interaktion zwischen IgA-Antikörpern mit Monozyten über den FcαRI beschrieben (Pilette 2010). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass mittels eines bispezifischen Antikörpers gegen ein Tumorantigen und den FcαRI mit Monozyten effektive Tumorzelllyse induziert werden konnte (Valerius 1997, Deo 1998). Allerdings wurde bisher nicht beschrieben, dass IgA-Antikörper Monozyten rekrutieren können, um via ADCC die Lyse von Tumorzellen zu induzieren. Die Rolle von Monozyten im Zusammenhang mit der Therapie von Tumoren ist bislang nicht eindeutig geklärt. Unter bestimmten Bedingungen bezüglich Anzahl und Aktivierungstatus der Monozyten könnten sie das Tumorstadium entweder erleichtern oder unterdrücken (Mytar 2008, Dickens 2009). Daneben gibt es Strategien aus Monozyten gereifte Makrophagen als Effektorzellen in der Immuntherapie von Tumoren einzusetzen (Oberling 1997). In welchem Umfang durch EGFR-gerichtete IgA-Antikörper rekrutierte Monozyten und Makrophagen ein antitumorales Potential insbesondere in vivo besitzen, wird die Fragestellung zukünftiger Experimente sein.

4.5. Funktionelle Charakterisierung von dimerem IgA1 – Die Rolle der Valenz

Die Ergebnisse der funktionellen Charakterisierung von dimerem 225-IgA1 in der vorliegenden Arbeit zeigten, dass dimeres 225-IgA1 signifikant effektiver im Vermitteln direkter Effektmechanismen (Bindung an EGFR-exprimierende Tumorzellen, Verdrängung des Liganden, Inhibition des Tumorstadiumwachstums) war als monomeres 225-IgA1. Dimeres 225-IgA1 könnte EGFR aufgrund seiner Tetravalenz effektiver kreuzvernetzen als monomeres 225-IgA1. Der Unterschied war jedoch nur bei nichtsättigenden Konzentrationen nachweisbar. Bei höheren Konzentrationen bindet dimeres IgA aus sterischen Gründen nur noch bivalent oder monovalent an den EGFR, wodurch sich seine Wirksamkeit auf die des monomeren IgA1 reduziert.

Auch bei Fc-vermittelten Effektormechanismen erzielte dimeres 225-IgA1 aufgrund der Tetravalenz und unbeeinflusst durch die C-terminal fusionierte Penta-Histidin-Markierung der J-Kette eine stärkere Wirkung als monomeres 225-IgA1. Mit einer indirekten Immunfluoreszenz konnte nachgewiesen werden, dass dimeres 225-IgA1

effektiver an Fc α RI-positive BHK-Transfektanten gebunden hat als monomeres 225-IgA1. Im Rahmen der Chromfreisetzungstests mit unfraktioniertem Vollblut und isolierten PMN bei niedrigeren E:T-Verhältnissen induzierte dimeres 225-IgA1 ebenfalls effizienter ADCC von Tumorzellen als monomeres 225-IgA1. Bei höheren Konzentrationen des Antikörpers oder der Effektorzellen glichen sich die Lyseraten an. Eine Erklärung hierfür liefern die Methoden zur Quantifizierung der Antikörper. Diese Methoden beruhen auf dem Prinzip der Proteinbestimmung. Damit wurde zwar der Proteingehalt aber nicht die Anzahl der Moleküle in den Präparationen bestimmt. Verglichen mit monomeren IgA verteilt sich im Falle des dimeren IgA der Proteingehalt auf halb so viele Moleküle. Effektiv wurde somit die Wirkung von einem Molekül dimerem IgA mit der Wirkung von zwei Molekülen monomerem IgA verglichen. Da mit einem Molekül dimerem IgA aber der gleiche bzw. ein stärkerer Effekt erzielt werden konnte wie mit zwei Molekülen monomerem IgA1, ergibt sich daraus für ein Molekül dimerem IgA eine höhere Wirksamkeit.

Für rekombinant hergestelltes dimeres IgA gibt es in der Literatur wenige Angaben über dessen funktionelle Eigenschaften. Im Rahmen von intensiven Interaktionsstudien konnte gezeigt werden, dass dimeres IgA effektiver und stabiler an Fc α RI binden kann als monomeres IgA (Oortwijn 2007). Darüber hinaus wurden durch *in silico*-Vorhersagen und Strukturanalysen auf der Basis von Neutronenstreuung insgesamt vier mögliche Bindestellen für Fc α RI pro Molekül dimerem IgA identifiziert (Bonner 2009). Da die Interaktion zwischen Fc α RI und IgA auf einer 2:1 Stöchiometrie beruht, könnte dimeres IgA mit vier Fc α RI-Molekülen interagieren und dadurch eine zweifach stärkere Aktivierung der Effektorzellen bewirken als ein Molekül monomeres IgA. Darüber hinaus verfügt dimeres IgA aufgrund der vier Fab-Domänen über vier mögliche Antigenbindungsstellen (Bonner 2009). Damit könnten theoretisch pro Molekül dimerem IgA vier Antigene gleichzeitig gebunden und kreuzvernetzt werden. Die Tetravalenz des dimeren IgA könnte somit dessen höhere Wirksamkeit erklären.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass hochreines dimeres IgA1 mit inkorporierter J-Kette in der Lage war, direkte und indirekte Effektmechanismen zu induzieren und in seiner Wirkung effektiver war als monomeres IgA1. Damit wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal gezeigt, dass dimeres IgA ein interessantes Therapeutikum für die Behandlung von EGFR-überexprimierenden Karzinomen darstellt.

4.6. Transzytose von dimerem IgA – Etablierung des *in vitro*-Testsystems

Transzytose ist ein funktioneller Aspekt von dimerem IgA, der sehr ausführlich und umfangreich in den letzten 40 Jahren untersucht und in der Literatur beschrieben wurde (Brandtzaeg 1981, Tamer 1995, Lewis 2005). Im humanen Organismus werden von Plasmazellen nur zwei Antikörpermoleküle generiert, die mittels Transzytose auf mukosale Oberflächen transportiert werden, dimeres IgA und pentameres IgM (Brandtzaeg 1987). Beiden Molekülen gemein ist die kovalente Stabilisierung durch die J-Kette (Janeway 2004). Die Verbindung mit dieser J-Kette ist eine essentielle Voraussetzung für die Interaktion mit dem polymeren Immunglobulin-Rezeptor (pIgR), welcher die Transzytose vermittelt (Johansen 1999, 2000, 2001). Die J-Kette initiiert die Bindung an die extrazelluläre Domäne des pIgR, die sekretorische Komponente (SC), und ermöglicht dadurch die Bildung einer Disulfidbrücke zwischen der D5-Domäne der SC und der C α 2-Domäne eines der Monomere im dimeren IgA. Dadurch entsteht sekretorisches IgA (SIgA). In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass im direkten Vergleich mit monomerem 225-IgA1, dimerem 225-IgA1 ohne J-Kette und einem Kontroll-IgA1 nur dimeres 225-IgA1 mit inkorporierter J-Kette in der Lage war, dosisabhängig an pIgR-exprimierende MDCK-Zellen zu binden.

Durch die Bindung des dimeren IgA an den pIgR kommt es zur Dimerisierung des Rezeptors, wodurch die Bindung von Adapterproteinen ermöglicht wird (Mostov 2000, Tuma 2003). Diese Adapterproteine initiieren zum einen die Bildung von Clathrinvesikeln und den gerichteten Transport und zum anderen wird durch die Freisetzung von IP₃ und Ca²⁺ die hochspezifische intrazelluläre Regulation der Transzytose und letzten Endes die Freisetzung des SIgAs auf der apikalen Seite der Epithelzelle bewirkt (Luton 1999, Mostov 2000, Tuma 2003). Auf dieser Seite wird die SC proteolytisch vom Rezeptor abgespalten und dissoziiert verbunden mit dimerem IgA als SIgA (Natvig 1997, Phalipon 2003). Für den Nachweis der Transzytose von dimerem IgA wurden in der Literatur mehrere *in vitro*-Modelle verwendet (Tuma 2003). Das Standardmodell stellen Mardin-Darby-Canine-Kidney-(MDCK) Zellen, tubuläre Nierenzellen des Cocker Spaniels, dar, welche mit humanem pIgR transfiziert wurden (Tamer 1995, Lewis 2005). Im Rahmen dieser Arbeit konnte dieses Modell rekonstruiert werden.

Wenn MDCK-Zellen auf einer porösen Oberfläche ausgesät werden, wachsen sie zu einer stabilen Schicht aus polarisierten Epithelzellen (Barker 1981). Ein Maß für die

Stabilität dieser Epithelschicht ist der transepitheliale Widerstand (TER), welcher ab 400Ω als ausreichend beschrieben wurde (Tuma 2003). Da die in dieser Arbeit verwendeten Einzellschichten einen TER von $800-1300 \Omega$ erzeugten, kann von einer sehr hohen Stabilität und Integrität ausgegangen werden. Unter diesen Bedingungen konnte gezeigt werden, dass dimeres 225-IgA1 mit inkorporierter J-Kette mit dem pIgR interagieren und im Rahmen eines Transzytosetests spezifisch von der basolateralen zur apikalen Seite der Epithelzellschicht transportiert werden konnte. Daneben wurde im apikalen Medium SIgA nachgewiesen, ein Beweis dafür, dass dimeres IgA mit der SC verbunden und diese von der apikalen Oberfläche abgespalten wurde. Dieses Ergebnis wurde auch für ein humanes Zellmodell wiederholt, das ebenfalls mehrfach in der Literatur als Modell beschrieben wurde, das humane Plattenepithelkarzinom der oberen Bronchien Calu3 (Godding 1998, Diebel 2006). Calu3-Zellen wachsen ähnlich wie MDCK-Zellen auf porösen Oberflächen zu einer dichten Epithelzellschicht. Allerdings waren die Epithelzellschichten von höherer Integrität, da der TER $\geq 1800 \Omega$ betrug. Die Calu3-Zellen exprimieren endogen sowohl pIgR als auch EGFR (Engelmann 2005). Dies konnte durch eine indirekte Immunfluoreszenz in dieser Arbeit gezeigt werden. Calu3-Zellen exprimieren im Vergleich zu den MDCK-Zellen weniger pIgR und weisen darüber hinaus eine schwache EGFR-Expression auf. Diese Koexpression von pIgR und EGFR sowie die niedrigere pIgR-Expression liefern eine Erklärung für die unvollständige Transzytose von dimerem IgA im Calu3-Modell.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass die C-terminal fusionierte Penta-Histidin-Markierung die Funktionalität des dimeren IgA in diesem Punkt nicht beeinträchtigte. Obwohl die Markierung am C-Terminus exponiert ist, wurde die Bindung an den pIgR und die Transzytose des dimeren IgA nicht beeinflusst.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte mit zwei verschiedenen Modellsystemen gezeigt werden, dass dimeres 225-IgA1 aufgrund der inkorporierten J-Kette mit dem pIgR interagieren und von diesem über den Prozess der Transzytose von der basolateralen zu apikalen Seite einer Epithelzellschicht transportiert wurde. Damit konnte eine wichtige funktionelle Eigenschaft des dimeren 225-IgA1 gezeigt, und die Voraussetzung für zukünftige *in vivo*-Modelle geschaffen werden.

4.7. Komplementinhibition durch IgA-Antikörper

Ein Ziel dieser Arbeit war, die Fähigkeit zur Komplementaktivierung zu untersuchen, um diesen Sachverhalt für die rekombinant hergestellten IgA-Antikörper zu klären. Es konnte gezeigt werden, dass alle IgA-Konstrukte nicht in der Lage waren das Komplementsystem zur Lyse von Tumorzellen zu rekrutieren. Allerdings waren auch IgG1-Antikörper nicht in der Lage, die Lyse von Tumorzellen zu induzieren. EGFR-Antikörper vermitteln alleine keine CDC (Dechant 2007). Nur Doppelkombinationen von EGFR-gerichteten IgG1-Antikörpern, welche unterschiedliche Epitope des EGFR erkennen sind effektiv darin CDC von Tumorzellen zu induzieren (Dechant 2007). Aber auch in Kombination mit Matuzumab, einem IgG1-Antikörper, war kein CDC mit IgA-Antikörpern initiiert worden. Darüber hinaus konnte im Rahmen von Dreifachkombinationen gezeigt werden, dass alle drei IgA-Konstrukte die Aktivierung des Komplements durch die IgG1-Doppelkombinationen inhibierten. Dieser Effekt war beim 225-IgA2-Monomer am stärksten. Auf der anderen Seite bewirkte die Zugabe eines dritten humanen IgG1, des 225-IgG1, eine weitere Verstärkung der Komplementaktivierung, wogegen der murine 225-IgG1 sowie auch das Kontroll-225-scFv-Fc-Fusionsprotein weder von stimulierender noch inhibierender Wirkung waren. Allerdings zeigte das mutierte 225-scFv-Fc eine ähnliche Wirkung wie die IgA-Antikörper. Als Grund für die unterschiedliche Wirkung konnte in einem ersten Versuch eine unterschiedlich starke Opsonisierung der Zielzellen durch IgG- und IgA-Antikörper ausgeschlossen werden. Hingegen gab es signifikante Unterschiede in der Fähigkeit C1q auf der Oberfläche der Zielzelle zu fixieren. Während ein dritter IgG1-Antikörper die C1q-Fixierung deutlich verstärken konnte, verhinderten beide IgA-Monomere signifikant die Deposition von C1q auf der Oberfläche von Tumorzellen (Lohse 2010).

Zusammenfassend konnte in diesen Versuchsreihen dargestellt werden, dass die rekombinant hergestellten IgA-Antikörper nicht das Komplementsystem aktivieren und sogar die Aktivierung des Komplements durch andere Antikörper, welche das gleiche Antigen binden, inhibierten. Im Gegensatz zu bisherigen Studien (Chintalacharuvu 1999, Jarvis 1991, Russell 1989) konnte gezeigt werden, dass die Inhibition des Komplements nicht spezifisch für die IgA-Antikörper war, sondern auf einer sterischen Hinderung der Bindung von Komplementkomponenten beruhte. Diese Schlussfolgerung wurde unterstützt durch den Grad der beobachteten Effekte der einzelnen Konstrukte: der murine IgG1 und das 225-scFc-Fv-Konstrukt zeigten

keinen Einfluss, 225-IgA1-Monomer und -Dimer blockierten das Vermitteln von CDC moderat, dagegen zeigte das 225-IgA2-Monomer und das mutierte 225-scFc-Fv die stärkste inhibitorische Wirkung. Dabei stellte der murine IgG1 das Konstrukt mit der höchsten Flexibilität dar. Die Flexibilität der Gelenkregion könnte auch hier den funktionellen Unterschied zwischen den Isotypen, besonders zwischen dem IgA2- und IgA1-Isotyp (Furtado 2004). Möglicherweise hat die Flexibilität in der Gelenkregion einen Einfluss auf die Komplement-aktivierenden oder inhibierenden Eigenschaften der Antikörper.

Die Aktivierung der Komplementkaskaden gehört zu einer in der Literatur sehr widersprüchlich diskutierten funktionellen Eigenschaft von IgA-Antikörpern. So gibt es Publikationen, die eine Aktivierung der alternativen und Lektin-basierten Komplementkaskaden durch IgA1-Antikörper unter bestimmten Versuchsbedingungen und bei bestimmten Glykosylierungsmustern beschreiben (Zhang 2006, Hiemstra 1987 und 1988, Nikolova 1994, Roos 2001). Darüber hinaus wurde demonstriert, dass diese Effekte auf die Fab2-Fragmente des IgA1-Isotyps beschränkt sind, da eine proteolytische Abspaltung der Fc-Domäne keinen Einfluss auf diese Effekte hatte (Russell 1989, Jarvis 1991). Auf der anderen Seite zeigten andere Gruppen wiederum, dass IgA-Antikörper unter anderen Bedingungen auch einen negativen Effekt auf die Komplementaktivierung haben können (Chintalacharuvu 1999).

4.8. Ausblick

Es gibt einige Eigenschaften der in dieser Arbeit hergestellten und charakterisierten Konstrukte, die im Folgenden noch untersucht werden sollen. Eine dieser Eigenschaften ist die Serumhalbwertszeit. Dieser Parameter wird beeinflusst durch die Bindung an ASGPR und Galectin-1 und die Resistenz der Antikörper gegenüber Proteasen (Woof 2006), die wiederum von der Glykosylierung der IgA-Antikörper abhängig sind (Mattu 2006). Darüber hinaus ist bisher nicht ausreichend geklärt, welchen Einfluss die Glykosylierung auf die Funktionalität der IgA-Antikörper generell hat, besonders in Bezug auf die Fc-vermittelten Effektmechanismen wie ADCC und CDC. Bei letzterem könnte die Art der Glykosylierung eine entscheidende Rolle spielen (Zhang 2004). Demzufolge wird es Ziel zukünftiger Analysen sein, von den rekombinanten IgA-Antikörpern ein Glykosylierungsprofil zu erstellen. Darüber hinaus sollen weitere Analysen klären, welche Glykosylierungsmuster (terminale Sialylsäure

oder Galaktose, Kern-Fukose oder –Mannose) einen Einfluss auf die Funktionalität haben und in wie weit sie die Feinausrichtung dieser bestimmen.

Ein wichtiger Aspekt der in kommenden Experimenten geklärt werden soll, ist das Verhalten der Antikörper *in vivo*. Dabei soll zunächst ein Verteilungsmodell etabliert werden, um zu untersuchen, wie sich die einzelnen IgA-Antikörper im Allgemeinen, und monomeres und dimeres IgA im Speziellen, im Organismus verteilen. Die Bildung von dimerem IgA, dessen Transzytose und die Funktionen von SIgA auf mukosalen Schleimhäuten sind unter Vertebraten stark konserviert (Piskurich 1995, Snoeck 2006, Braathen 2007). Theoretisch zu erwarten wäre somit eine Anreicherung von IgA-Monomeren in der Leber und von IgA-Dimeren auf mukosalen Epithelien. In einem weiteren Modell soll die Wirksamkeit der Antikörper im Tiermodell überprüft werden. Hierbei soll ebenfalls überprüft werden, ob die Penta-Histidin-Markierung am C-Terminus der in das dimere IgA inkorporierten J-Kette einen Einfluss auf die Funktionalität des Proteins *in vivo* bzw. für sich einen negativen Einfluss auf den Organismus hat.

Bei der Wahl des geeigneten Tiermodells ist zu berücksichtigen, dass Fc α RI unter Säugetieren unterschiedlich stark konserviert ist. Bisher konnten Orthologe des humanen Fc α RI im Hund, dem Schwein, dem Rind und unter Nagetieren bei Ratten, Hamstern und Wüstenspringmäusen nachgewiesen werden (Maruoka 2004). Dagegen haben Mäuse nach der phylogenetischen Spaltung von Ratten den Fc α RI verloren. Dies bedeutet, dass in einem murinen Tiermodell keine CD89-vermittelten Effekte untersucht werden können. Demzufolge müssten für ein murines Modell CD89 transgene Mäuse generiert werden, um auch die indirekten Wirkmechanismen untersuchen zu können. Alternativ könnten Tierversuche mit Ratten als Modellorganismus etabliert werden, da diese ein Ortholog des humanen CD89 exprimieren. Bisher liegen allerdings keine funktionellen Untersuchungen vor, ob die CD89-positive Granulozyten der Ratten durch humane IgA-Antikörper für ADCC von Tumorzellen rekrutiert werden können. Die Etablierung eines geeigneten Tiermodells stellt somit ein Kernproblem geplanter *in vivo*-Experimente dar.

5. Zusammenfassung

In der Therapie von epithelialen Karzinomen spielt die Behandlung mit Antigen-spezifischen Antikörpern eine große Rolle. Bei der Entwicklung von therapeutischen Antikörpern erwies sich der Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors (EGFR) als geeignete Zielstruktur. Endogen exprimiert erfüllt er wichtige physiologische Funktionen bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung der Epithelien. Die Überexpression des EGFR führt zu einem konstitutiven Anschalten von karzinomfördernden Signalwegen. Zwar sind die bisher klinisch erprobten Antikörper vom IgG-Isotyp, jedoch verfügen Antikörper vom IgA-Isotyp über interessante Eigenschaften. Im Gegensatz zu IgG- rekrutieren IgA-Antikörper keine NK-Zellen und aktivieren Monozyten und besonders effektiv Granulozyten. Diese stellen zwei für die Bekämpfung von soliden Tumoren wichtige und prozentual größere Effektorzellpopulationen dar. Zusätzlich ließe sich das Potential dieser Zellen durch Zugabe von Cytokinen (GM-CSF, G-CSF) weiter steigern. Im Unterschied zu IgG- diffundieren IgA-Antikörper in ihrer dimeren Form schneller durch Basalmembranen und werden durch Transzytose auf Epithelien transportiert.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten neue Verfahren für die Produktion und Aufreinigung von rekombinanten EGFR-gerichteten IgA-Antikörpern etabliert werden. Somit wird es nun möglich, ausreichende Mengen für klinische Anwendungen herzustellen. An den C-Terminus der J-Kette wurde eine Penta-Histidin-Markierung fusioniert. Dadurch war es möglich dimeres IgA spezifisch aufzureinigen und die Inkorporation der J-Kette nachzuverfolgen. Die weitere biochemische Charakterisierung ergab, dass die aufgereinigten Konstrukte aus korrekt zusammengebauten hochreinen monomerem und dimerem IgA bestanden. Die Charakterisierung der funktionellen Eigenschaften zeigte, dass die hergestellten IgA-Antikörper vergleichbar zu Kontrollantikörpern an EGFR und Fc α RI banden sowie die Ligandenbindung blockierten, das Tumorzellwachstum inhibierten und antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) vermittelten. Zum ersten Mal konnte gezeigt werden, dass hochreines definiertes monomeres und insbesondere dimeres IgA in der Lage waren Granulozyten und Monozyten zu rekrutieren. Dabei war der IgA2-Isotyp am effektivsten im Induzieren von ADCC. Dimeres IgA war in seiner direkten und indirekten Wirkung auf Tumorzellen effektiver als monomeres IgA. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass dimeres IgA durch die Bindung an den plgR

mittels Transzytose eine Epithelzellschicht durchquerte. Darüber hinaus konnte für alle IgA-Antikörper gezeigt werden, dass sie nicht das Komplementsystem für die Lyse von Tumorzellen induzieren konnten. Im Rahmen dieser Arbeit konnten somit wichtige Voraussetzungen für nachfolgende (*in vivo*-) Experimente geschaffen werden.

6. Summary

Antigen-specific antibody treatment plays an important role in the medical therapy of epithelial carcinoma diseases. The receptor of the epidermal growth factor (EGFR) has been shown to be a useful antigen in the development of therapeutic antibodies. Endogenously expressed, it plays important physiological roles in the development and maintenance of epithelial tissues. Overexpression of EGFR leads to constitutively activated carcinoma-promoting signal pathways. Approved EGFR-directed antibodies are of IgG isotype, but antibodies of IgA isotype are shown to have interesting properties. In contrast to IgG antibodies, antibodies of IgA isotype do not recruit NK cells, but activate monocytes and, particularly effectively, granulocytes, two effector cell populations displaying the larger population and important for combatting solid tumors. Additionally, the potential of these cells could be further increased by applying cytokines (GM-CSF, G-CSF). Furthermore, in their dimeric form IgA but not IgG antibodies can cross basallaminae faster and are transported onto mucosal surfaces via transcytosis.

In the presented work, new procedures for the production and purification of recombinant monoclonal monomeric as well as dimeric IgA antibodies directed against the EGFR have been established. Sufficient amounts for clinical trials can now be produced. For the purification of dimeric IgA antibodies, a histidin-tag was fused to the C-terminal end of the J chain to analyse whether the J chain has been correctly incorporated. Further biochemical characterization confirmed correct conformation of the purified monomeric and dimeric antibody constructs and showed that they were of high purity. In functional analysis the IgA antibodies displayed binding to EGFR and Fc α RI and mediated ligand blocking, inhibition of cell growth and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) comparable to control antibodies. Pure and defined monomeric and especially dimeric IgA were shown for the first time to recruit granulocytes and monocytes. Antibodies of IgA2 isotype were more effective in triggering ADCC. Dimeric IgA was more efficient in mediating direct and indirect effects on tumor cells than monomeric IgA. Furthermore, transcytose assays revealed that dimeric IgA antibodies could be transported from polarized epithelial cells via binding to the pIgR. None of the IgA antibodies were able to induce complement-dependent lysis of tumor cells. Finally, this work developed the requirements for the following in vivo experiments.

7. Referenzen

1. Allegra, C.J., et al., American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. *J Clin Oncol*, 2009. 27(12): p. 2091-6.
2. Andl, C.D., et al., EGFR-induced cell migration is mediated predominantly by the JAK-STAT pathway in primary esophageal keratinocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2004. 287(6): p. G1227-37.
3. Areschoug, T., et al., Streptococcal beta protein has separate binding sites for human factor H and IgA-Fc. *J Biol Chem*, 2002. 277(15): p. 12642-8.
4. Babior, B.M., NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol*, 2004. 16(1): p. 42-7.
5. Bakema, J.E., et al., Signaling through mutants of the IgA receptor CD89 and consequences for Fc receptor gamma-chain interaction. *J Immunol*, 2006. 176(6): p. 3603-10.
6. Barker, G. and N.L. Simmons, Identification of two strains of cultured canine renal epithelial cells (MDCK cells) which display entirely different physiological properties. *Q J Exp Physiol*, 1981. 66(1): p. 61-72.
7. Baselga, J., Targeting the epidermal growth factor receptor: a clinical reality. *J Clin Oncol*, 2001. 19(18 Suppl): p. 41S-44S.
8. Belew, M., et al., A one-step purification method for monoclonal antibodies based on salt-promoted adsorption chromatography on a 'thiophilic' adsorbent. *J Immunol Methods*, 1987. 102(2): p. 173-82.
9. Beyer, T., et al., Serum-free production and purification of chimeric IgA antibodies. *J Immunol Methods*, 2009. 346(1-2): p. 26-37.
10. Bibeau, F., et al., Impact of Fc{gamma}RIIIa-Fc{gamma}RIIIa polymorphisms and KRAS mutations on the clinical outcome of patients with metastatic colorectal cancer treated with cetuximab plus irinotecan. *J Clin Oncol*, 2009. 27(7): p. 1122-9.
11. Boel, E., et al., Functional human monoclonal antibodies of all isotypes constructed from phage display library-derived single-chain Fv antibody fragments. *J Immunol Methods*, 2000. 239(1-2): p. 153-66.
12. Bonner, A., et al., The nonplanar secretory IgA2 and near planar secretory IgA1 solution structures rationalize their different mucosal immune responses. *J Biol Chem*, 2009. 284(8): p. 5077-87.

13. Bonner, A., et al., Implications of the near-planar solution structure of human myeloma dimeric IgA1 for mucosal immunity and IgA nephropathy. *J Immunol*, 2008. 180(2): p. 1008-18.
14. Bonner, A., et al., Solution structure of human secretory component and implications for biological function. *J Biol Chem*, 2007. 282(23): p. 16969-80.
15. Borregaard, N. and J.B. Cowland, Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood*, 1997. 89(10): p. 3503-21.
16. Boullier, S., et al., Secretory IgA-mediated neutralization of *Shigella flexneri* prevents intestinal tissue destruction by down-regulating inflammatory circuits. *J Immunol*, 2009. 183(9): p. 5879-85.
17. Bowman, E.P., et al., The intestinal chemokine thymus-expressed chemokine (CCL25) attracts IgA antibody-secreting cells. *J Exp Med*, 2002. 195(2): p. 269-75.
18. Braathen, R., et al., Secretory antibody formation: conserved binding interactions between J chain and polymeric Ig receptor from humans and amphibians. *J Immunol*, 2007. 178(3): p. 1589-97.
19. Brandtzaeg, P., Immunochemical studies on free and bound J chain of human IgA and IgM. *Scand J Immunol*, 1975. 4(5-6): p. 439-50.
20. Brandtzaeg, P., Transport models for secretory IgA and secretory IgM. *Clin Exp Immunol*, 1981. 44(2): p. 221-32.
21. Brandtzaeg, P., Mucosal immunity: induction, dissemination, and effector functions. *Scand J Immunol*, 2009. 70(6): p. 505-15.
22. Brandtzaeg, P., et al., Production and secretion of immunoglobulins in the gastrointestinal tract. *Ann Allergy*, 1987. 59(5 Pt 2): p. 21-39.
23. Browne, S.M. and M. Al-Rubeai, Selection methods for high-producing mammalian cell lines. *Trends Biotechnol*, 2007. 25(9): p. 425-32.
24. Bruggemann, M., et al., Comparison of the effector functions of human immunoglobulins using a matched set of chimeric antibodies. *J Exp Med*, 1987. 166(5): p. 1351-61.
25. Burns, J.W., et al., Protective effect of rotavirus VP6-specific IgA monoclonal antibodies that lack neutralizing activity. *Science*, 1996. 272(5258): p. 104-7.
26. Burritt, M.F., et al., Activation of the classical complement pathway by Fc fragment of human IgA. *J Immunol*, 1977. 118(2): p. 723-5.

27. Challacombe, J.M., et al., Neutrophils are a key component of the antitumor efficacy of topical chemotherapy with ingenol-3-angelate. *J Immunol*, 2006. 177(11): p. 8123-32.
28. Chintalacharuvu, K.R. and S.L. Morrison, Production and characterization of recombinant IgA. *Immunotechnology*, 1999. 4(3-4): p. 165-74.
29. Chu, L. and D.K. Robinson, Industrial choices for protein production by large-scale cell culture. *Curr Opin Biotechnol*, 2001. 12(2): p. 180-7.
30. Chung, C.H., et al., Increased epidermal growth factor receptor gene copy number is associated with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinomas. *J Clin Oncol*, 2006. 24(25): p. 4170-6.
31. Chung, I., et al., Spatial control of EGF receptor activation by reversible dimerization on living cells. *Nature*. 464(7289): p. 783-7.
32. Ciardiello, F. and G. Tortora, EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med*, 2008. 358(11): p. 1160-74.
33. Clark, A.J., et al., Calicum microdomains form within neutrophils at the neutrophil-tumor cell synapse: role in antibody-dependent target cell apoptosis. *Cancer Immunol Immunother*. 59(1): p. 149-59.
34. Clark, A.J. and H.R. Petty, A cell permeant peptide containing the cytoplasmic tail sequence of Fc receptor type IIA reduces calcium signaling and phagolysosome formation in neutrophils. *Cell Immunol*. 261(2): p. 153-8.
35. Coffman, R.L., D.A. Leberman, and B. Shrader, Transforming growth factor beta specifically enhances IgA production by lipopolysaccharide-stimulated murine B lymphocytes. *J Exp Med*, 1989. 170(3): p. 1039-44.
36. Coffman, R.L., H.F. Savelkoul, and D.A. Leberman, Cytokine regulation of immunoglobulin isotype switching and expression. *Semin Immunol*, 1989. 1(1): p. 55-63.
37. Corthesy, B., Roundtrip ticket for secretory IgA: role in mucosal homeostasis? *J Immunol*, 2007. 178(1): p. 27-32.
38. Cragg, M.S., et al., Analysis of the interaction of monoclonal antibodies with surface IgM on neoplastic B-cells. *Br J Cancer*, 1999. 79(5-6): p. 850-7.
39. Cullen, S.P. and S.J. Martin, Mechanisms of granule-dependent killing. *Cell Death Differ*, 2008. 15(2): p. 251-62.

40. Cunningham, D., et al., Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*, 2004. 351(4): p. 337-45.
41. Dechant, M., et al., Effector mechanisms of recombinant IgA antibodies against epidermal growth factor receptor. *J Immunol*, 2007. 179(5): p. 2936-43.
42. Dechant, M., et al., Complement-dependent tumor cell lysis triggered by combinations of epidermal growth factor receptor antibodies. *Cancer Res*, 2008. 68(13): p. 4998-5003.
43. Della Corte, E. and R.M. Parkhouse, Biosynthesis of immunoglobulin A (IgA) and immunoglobulin M (IgM). Requirement for J chain and a disulphide-exchanging enzyme for polymerization. *Biochem J*, 1973. 136(3): p. 597-606.
44. Deo, Y.M., et al., Bispecific molecules directed to the Fc receptor for IgA (Fc alpha RI, CD89) and tumor antigens efficiently promote cell-mediated cytotoxicity of tumor targets in whole blood. *J Immunol*, 1998. 160(4): p. 1677-86.
45. Di Gaetano, N., et al., Complement activation determines the therapeutic activity of rituximab in vivo. *J Immunol*, 2003. 171(3): p. 1581-7.
46. Dickens, D.S. and P.T. Jubinsky, Therapeutic strategies for targeting mononuclear phagocytes in cancer. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2009. 31(1): p. 14-7.
47. Diebel, L.N., et al., A comparative study of secretory immunoglobulin A and immunoglobulin G in host defense in an in vitro pneumonia model. *Am J Surg*, 2006. 191(3): p. 386-90.
48. Donadio, J.V. and J.P. Grande, IgA nephropathy. *N Engl J Med*, 2002. 347(10): p. 738-48.
49. Doody, J.F., et al., Inhibitory activity of cetuximab on epidermal growth factor receptor mutations in non small cell lung cancers. *Mol Cancer Ther*, 2007. 6(10): p. 2642-51.
50. Earp, H.S., 3rd, B.F. Calvo, and C.I. Sartor, The EGF receptor family--multiple roles in proliferation, differentiation, and neoplasia with an emphasis on HER4. *Trans Am Clin Climatol Assoc*, 2003. 114: p. 315-33; discussion 333-4.
51. Engelman, J.A., et al., ErbB-3 mediates phosphoinositide 3-kinase activity in gefitinib-sensitive non-small cell lung cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(10): p. 3788-93.
52. Fagarasan, S. and T. Honjo, Regulation of IgA synthesis at mucosal surfaces. *Curr Opin Immunol*, 2004. 16(3): p. 277-83.

53. Falkenberg, F.W., et al., In vitro production of monoclonal antibodies in high concentration in a new and easy to handle modular minifermenter. *J Immunol Methods*, 1995. 179(1): p. 13-29.
54. Favre, L.I., F. Spertini, and B. Corthesy, Simplified procedure to recover recombinant antigenized secretory IgA to be used as a vaccine vector. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2003. 786(1-2): p. 143-51.
55. Fernandez, M.I., et al., Anti-inflammatory role for intracellular dimeric immunoglobulin a by neutralization of lipopolysaccharide in epithelial cells. *Immunity*, 2003. 18(6): p. 739-49.
56. Ferrara, N., VEGF-A: a critical regulator of blood vessel growth. *Eur Cytokine Netw*, 2009. 20(4): p. 158-63.
57. Franco, M.A. and H.B. Greenberg, Immunity to rotavirus in T cell deficient mice. *Virology*, 1997. 238(2): p. 169-79.
58. Frederick, L., et al., Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas. *Cancer Res*, 2000. 60(5): p. 1383-7.
59. Furtado, P.B., et al., Solution structure determination of monomeric human IgA2 by X-ray and neutron scattering, analytical ultracentrifugation and constrained modelling: a comparison with monomeric human IgA1. *J Mol Biol*, 2004. 338(5): p. 921-41.
60. Garrett, T.P., et al., Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha. *Cell*, 2002. 110(6): p. 763-73.
61. Ghetie, V. and E.S. Ward, Multiple roles for the major histocompatibility complex class I-related receptor FcRn. *Annu Rev Immunol*, 2000. 18: p. 739-66.
62. Ghetie, V. and E.S. Ward, Transcytosis and catabolism of antibody. *Immunol Res*, 2002. 25(2): p. 97-113.
63. Godding, V., et al., Secretory component production by human bronchial epithelial cells is upregulated by interferon gamma. *Eur Respir J*, 1998. 11(5): p. 1043-52.
64. Gomes, M.M., et al., Analysis of IgA1 N-glycosylation and its contribution to FcalphaRI binding. *Biochemistry*, 2008. 47(43): p. 11285-99.
65. Gregory, R.L., J. Rundegren, and R.R. Arnold, Separation of human IgA1 and IgA2 using jacalin-agarose chromatography. *J Immunol Methods*, 1987. 99(1): p. 101-6.

66. Guy, P.M., et al., Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91(17): p. 8132-6.
67. Hammerman, P.S., P.A. Janne, and B.E. Johnson, Resistance to Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res*, 2009. 15(24): p. 7502-7509.
68. Hiemstra, P.S., et al., Activation of complement by human serum IgA, secretory IgA and IgA1 fragments. *Mol Immunol*, 1988. 25(6): p. 527-33.
69. Hiemstra, P.S., et al., Activation of the alternative pathway of complement by human serum IgA. *Adv Exp Med Biol*, 1987. 216B: p. 1297-302.
70. Husband, A.J. and J.L. Gowans, The origin and antigen-dependent distribution of IgA-containing cells in the intestine. *J Exp Med*, 1978. 148(5): p. 1146-60.
71. Idusogie, E.E., et al., Engineered antibodies with increased activity to recruit complement. *J Immunol*, 2001. 166(4): p. 2571-5.
72. Introna, M. and J. Golay, Complement in antibody therapy: friend or foe? *Blood*, 2009. 114(26): p. 5247-8.
73. Jaganjac, M., et al., Granulocytes as effective anticancer agent in experimental solid tumor models. *Immunobiology*.
74. Jarvis, G.A. and J.M. Griffiss, Human IgA1 initiates complement-mediated killing of *Neisseria meningitidis*. *J Immunol*, 1989. 143(5): p. 1703-9.
75. Johannessen, L.E., et al., Heterodimerization of the epidermal-growth-factor (EGF) receptor and ErbB2 and the affinity of EGF binding are regulated by different mechanisms. *Biochem J*, 2001. 356(Pt 1): p. 87-96.
76. Johansen, F.E., R. Braathen, and P. Brandtzaeg, Role of J chain in secretory immunoglobulin formation. *Scand J Immunol*, 2000. 52(3): p. 240-8.
77. Johansen, F.E., R. Braathen, and P. Brandtzaeg, The J chain is essential for polymeric Ig receptor-mediated epithelial transport of IgA. *J Immunol*, 2001. 167(9): p. 5185-92.
78. Johansen, F.E., et al., Recombinant expression of polymeric IgA: incorporation of J chain and secretory component of human origin. *Eur J Immunol*, 1999. 29(5): p. 1701-8.
79. Jones, J.T., R.W. Akita, and M.X. Sliwkowski, Binding specificities and affinities of egf domains for ErbB receptors. *FEBS Lett*, 1999. 447(2-3): p. 227-31.
80. Kaetzel, C.S., The polymeric immunoglobulin receptor: bridging innate and adaptive immune responses at mucosal surfaces. *Immunol Rev*, 2005. 206: p. 83-99.

81. Karunagaran, D., et al., ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer. *Embo J*, 1996. 15(2): p. 254-64.
82. Keler, T., et al., Differential effect of cytokine treatment on Fc alpha receptor I- and Fc gamma receptor I-mediated tumor cytotoxicity by monocyte-derived macrophages. *J Immunol*, 2000. 164(11): p. 5746-52.
83. Kerr, M.A., The structure and function of human IgA. *Biochem J*, 1990. 271(2): p. 285-96.
84. Kiyota, A., et al., Expression of a truncated epidermal growth factor receptor in oral squamous cell carcinomas. *Cancer Lett*, 2000. 161(1): p. 9-15.
85. Kloth, M.T., et al., STAT5b, a Mediator of Synergism between c-Src and the Epidermal Growth Factor Receptor. *J Biol Chem*, 2003. 278(3): p. 1671-9.
86. Kramer, D.R. and J.J. Cebra, Early appearance of "natural" mucosal IgA responses and germinal centers in suckling mice developing in the absence of maternal antibodies. *J Immunol*, 1995. 154(5): p. 2051-62.
87. Kramer, D.R. and J.J. Cebra, Role of maternal antibody in the induction of virus specific and bystander IgA responses in Peyer's patches of suckling mice. *Int Immunol*, 1995. 7(6): p. 911-8.
88. Krugmann, S., et al., Structural requirements for assembly of dimeric IgA probed by site-directed mutagenesis of J chain and a cysteine residue of the alpha-chain CH2 domain. *J Immunol*, 1997. 159(1): p. 244-9.
89. Kunitomo, D.Y., G.R. Harriman, and W. Strober, Regulation of IgA differentiation in CH12LX B cells by lymphokines. IL-4 induces membrane IgM-positive CH12LX cells to express membrane IgA and IL-5 induces membrane IgA-positive CH12LX cells to secrete IgA. *J Immunol*, 1988. 141(3): p. 713-20.
90. Kunkel, E.J. and E.C. Butcher, Plasma-cell homing. *Nat Rev Immunol*, 2003. 3(10): p. 822-9.
91. Kurai, J., et al., Antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by cetuximab against lung cancer cell lines. *Clin Cancer Res*, 2007. 13(5): p. 1552-61.
92. Lammerts van Bueren, J.J., et al., The antibody zalutumumab inhibits epidermal growth factor receptor signaling by limiting intra- and intermolecular flexibility. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. 105(16): p. 6109-14.
93. Leibl, H., R. Tomasits, and J.W. Mannhalter, Isolation of human serum IgA using thiophilic adsorption chromatography. *Protein Expr Purif*, 1995. 6(4): p. 408-10.

94. Lewis, M.J., et al., Structural requirements for the interaction of human IgA with the human polymeric Ig receptor. *J Immunol*, 2005. 175(10): p. 6694-701.
95. Lindahl, G., et al., Characterization of an IgA receptor from group B streptococci: specificity for serum IgA. *Eur J Immunol*, 1990. 20(10): p. 2241-7.
96. Liu, B., et al., Induction of apoptosis and activation of the caspase cascade by anti-EGF receptor monoclonal antibodies in DiFi human colon cancer cells do not involve the c-jun N-terminal kinase activity. *Br J Cancer*, 2000. 82(12): p. 1991-9.
97. Lucas, G.P., C.L. Cambiaso, and J.P. Vaerman, Protection of rat intestine against cholera toxin challenge by monoclonal anti-idiotypic antibody immunization via enteral and parenteral routes. *Infect Immun*, 1991. 59(10): p. 3651-8.
98. Luton, F. and K.E. Mostov, Transduction of basolateral-to-apical signals across epithelial cells: ligand-stimulated transcytosis of the polymeric immunoglobulin receptor requires two signals. *Mol Biol Cell*, 1999. 10(5): p. 1409-27.
99. Luton, F., et al., The SRC family protein tyrosine kinase p62yes controls polymeric IgA transcytosis in vivo. *Mol Cell*, 1999. 4(4): p. 627-32.
100. Macpherson, A.J. and T. Uhr, Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science*, 2004. 303(5664): p. 1662-5.
101. Maloney, D.G., B. Smith, and A. Rose, Rituximab: mechanism of action and resistance. *Semin Oncol*, 2002. 29(1 Suppl 2): p. 2-9.
102. Mantis, N.J., et al., Selective adherence of IgA to murine Peyer's patch M cells: evidence for a novel IgA receptor. *J Immunol*, 2002. 169(4): p. 1844-51.
103. Mantis, N.J., et al., Inhibition of HIV-1 infectivity and epithelial cell transfer by human monoclonal IgG and IgA antibodies carrying the b12 V region. *J Immunol*, 2007. 179(5): p. 3144-52.
104. Martinelli, E., et al., Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies in cancer therapy. *Clin Exp Immunol*, 2009. 158(1): p. 1-9.
105. Maruoka, T., T. Nagata, and M. Kasahara, Identification of the rat IgA Fc receptor encoded in the leukocyte receptor complex. *Immunogenetics*, 2004. 55(10): p. 712-6.
106. Mattu, T.S., et al., The glycosylation and structure of human serum IgA1, Fab, and Fc regions and the role of N-glycosylation on Fc alpha receptor interactions. *J Biol Chem*, 1998. 273(4): p. 2260-72.
107. Miettinen, P.J., et al., Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. *Nature*, 1995. 376(6538): p. 337-41.

108. Miller, W.E., H.S. Earp, and N. Raab-Traub, The Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces expression of the epidermal growth factor receptor. *J Virol*, 1995. 69(7): p. 4390-8.
109. Monteiro, R.C., H. Kubagawa, and M.D. Cooper, Cellular distribution, regulation, and biochemical nature of an Fc alpha receptor in humans. *J Exp Med*, 1990. 171(3): p. 597-613.
110. Monteiro, R.C., et al., Pathogenic significance of IgA receptor interactions in IgA nephropathy. *Trends Mol Med*, 2002. 8(10): p. 464-8.
111. Monteiro, R.C. and J.G. Van De Winkel, IgA Fc receptors. *Annu Rev Immunol*, 2003. 21: p. 177-204.
112. Morton, H.C., et al., Purification and characterization of chimeric human IgA1 and IgA2 expressed in COS and Chinese hamster ovary cells. *J Immunol*, 1993. 151(9): p. 4743-52.
113. Morton, H.C., et al., Functional association between the human myeloid immunoglobulin A Fc receptor (CD89) and FcR gamma chain. Molecular basis for CD89/FcR gamma chain association. *J Biol Chem*, 1995. 270(50): p. 29781-7.
114. Morton, H.C., M. van Egmond, and J.G. van de Winkel, Structure and function of human IgA Fc receptors (Fc alpha R). *Crit Rev Immunol*, 1996. 16(4): p. 423-40.
115. Mota, G., et al., Human NK cells express Fc receptors for IgA which mediate signal transduction and target cell killing. *Eur J Immunol*, 2003. 33(8): p. 2197-205.
116. Moura, I.C., et al., Identification of the transferrin receptor as a novel immunoglobulin (Ig)A1 receptor and its enhanced expression on mesangial cells in IgA nephropathy. *J Exp Med*, 2001. 194(4): p. 417-25.
117. Mukherjee, B., et al., EGFRvIII and DNA double-strand break repair: a molecular mechanism for radioresistance in glioblastoma. *Cancer Res*, 2009. 69(10): p. 4252-9.
118. Musolino, A., et al., Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with HER-2/neu-positive metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*, 2008. 26(11): p. 1789-96.
119. Mytar, B., et al., Human monocytes both enhance and inhibit the growth of human pancreatic cancer in SCID mice. *Anticancer Res*, 2008. 28(1A): p. 187-92.
120. Natvig, I.B., et al., Mechanism for enhanced external transfer of dimeric IgA over pentameric IgM: studies of diffusion, binding to the human polymeric Ig receptor, and epithelial transcytosis. *J Immunol*, 1997. 159(9): p. 4330-40.

121. Nikolova, E.B., M. Tomana, and M.W. Russell, The role of the carbohydrate chains in complement (C3) fixation by solid-phase-bound human IgA. *Immunology*, 1994. 82(2): p. 321-7.
122. Nilson, B.H., et al., Purification of antibodies using protein L-binding framework structures in the light chain variable domain. *J Immunol Methods*, 1993. 164(1): p. 33-40.
123. Novak, J., et al., IgA glycosylation and IgA immune complexes in the pathogenesis of IgA nephropathy. *Semin Nephrol*, 2008. 28(1): p. 78-87.
124. Oberling, F., Monocyte/macrophages as effector cells in cancer immunotherapy. *Transfus Sci*, 1997. 18(2): p. 243-50.
125. Ogiso, H., et al., Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell*, 2002. 110(6): p. 775-87.
126. Okabe, T., et al., Differential constitutive activation of the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer cells bearing EGFR gene mutation and amplification. *Cancer Res*, 2007. 67(5): p. 2046-53.
127. Oortwijn, B.D., et al., Monomeric and polymeric IgA show a similar association with the myeloid Fc α RI/CD89. *Mol Immunol*, 2007. 44(5): p. 966-73.
128. Otten, M.A. and M. van Egmond, The Fc receptor for IgA (Fc α RI, CD89). *Immunol Lett*, 2004. 92(1-2): p. 23-31.
129. Ozawa, S., et al., Prognostic significance of epidermal growth factor receptor in esophageal squamous cell carcinomas. *Cancer*, 1989. 63(11): p. 2169-73.
130. Pao, W. and V.A. Miller, Epidermal growth factor receptor mutations, small-molecule kinase inhibitors, and non-small-cell lung cancer: current knowledge and future directions. *J Clin Oncol*, 2005. 23(11): p. 2556-68.
131. Pao, W., et al., KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. *PLoS Med*, 2005. 2(1): p. e17.
132. Peipp, M., M. Dechant, and T. Valerius, Effector mechanisms of therapeutic antibodies against ErbB receptors. *Curr Opin Immunol*, 2008. 20(4): p. 436-43.
133. Peipp, M., M. Dechant, and T. Valerius, Sensitivity and resistance to EGF-R inhibitors: approaches to enhance the efficacy of EGF-R antibodies. *MAbs*, 2009. 1(6): p. 590-9.
134. Peipp, M., et al., Tumor cell killing mechanisms of epidermal growth factor receptor (EGFR) antibodies are not affected by lung cancer-associated EGFR kinase mutations. *J Immunol*, 2008. 180(6): p. 4338-45.

135. Peng, D., et al., Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody 225 up-regulates p27KIP1 and induces G1 arrest in prostatic cancer cell line DU145. *Cancer Res*, 1996. 56(16): p. 3666-9.
136. Perosa, F., et al., Purification of human immunoglobulins by sequential precipitation with caprylic acid and ammonium sulphate. *J Immunol Methods*, 1990. 128(1): p. 9-16.
137. Phalipon, A. and B. Corthesy, Novel functions of the polymeric Ig receptor: well beyond transport of immunoglobulins. *Trends Immunol*, 2003. 24(2): p. 55-8.
138. Phillips-Quagliata, J.M., et al., The IgA/IgM receptor expressed on a murine B cell lymphoma is poly-Ig receptor. *J Immunol*, 2000. 165(5): p. 2544-55.
139. Pilette, C., et al., Induction of interleukin-10 expression through Fc α 1 receptor in human monocytes and monocyte-derived dendritic cells: role of p38 MAPKinase. *Immunol Cell Biol*.
140. Piskurich, J.F., et al., Molecular cloning of the mouse polymeric Ig receptor. Functional regions of the molecule are conserved among five mammalian species. *J Immunol*, 1995. 154(4): p. 1735-47.
141. Pleass, R.J., et al., Identification of residues in the CH2/CH3 domain interface of IgA essential for interaction with the human fca1 receptor (Fc α 1R) CD89. *J Biol Chem*, 1999. 274(33): p. 23508-14.
142. Renegar, K.B., et al., Impairment of mucosal immunity by total parenteral nutrition: requirement for IgA in murine nasotracheal anti-influenza immunity. *J Immunol*, 2001. 166(2): p. 819-25.
143. Renegar, K.B., et al., Impairment of mucosal immunity by parenteral nutrition: depressed nasotracheal influenza-specific secretory IgA levels and transport in parenterally fed mice. *Ann Surg*, 2001. 233(1): p. 134-8.
144. Renegar, K.B. and P.A. Small, Jr., Passive transfer of local immunity to influenza virus infection by IgA antibody. *J Immunol*, 1991. 146(6): p. 1972-8.
145. Renegar, K.B. and P.A. Small, Jr., Immunoglobulin A mediation of murine nasal anti-influenza virus immunity. *J Virol*, 1991. 65(4): p. 2146-8.
146. Rey, J., et al., Targeting of secretory IgA to Peyer's patch dendritic and T cells after transport by intestinal M cells. *J Immunol*, 2004. 172(5): p. 3026-33.
147. Rifai, A., et al., The N-glycans determine the differential blood clearance and hepatic uptake of human immunoglobulin (Ig)A1 and IgA2 isotypes. *J Exp Med*, 2000. 191(12): p. 2171-82.

148. Rivera, F., et al., Current situation of Panitumumab, Matuzumab, Nimotuzumab and Zalutumumab. *Acta Oncol*, 2008. 47(1): p. 9-19.
149. Roos, A., et al., Human IgA activates the complement system via the mannan-binding lectin pathway. *J Immunol*, 2001. 167(5): p. 2861-8.
150. Roth, R.A. and M.E. Koshland, Role of disulfide interchange enzyme in immunoglobulin synthesis. *Biochemistry*, 1981. 20(23): p. 6594-9.
151. Rudd, P.M., M.R. Wormald, and R.A. Dwek, Sugar-mediated ligand-receptor interactions in the immune system. *Trends Biotechnol*, 2004. 22(10): p. 524-30.
152. Russell, M.W. and B. Mansa, Complement-fixing properties of human IgA antibodies. Alternative pathway complement activation by plastic-bound, but not specific antigen-bound, IgA. *Scand J Immunol*, 1989. 30(2): p. 175-83.
153. Russell, M.W., J. Reinholdt, and M. Kilian, Anti-inflammatory activity of human IgA antibodies and their Fab alpha fragments: inhibition of IgG-mediated complement activation. *Eur J Immunol*, 1989. 19(12): p. 2243-9.
154. Sakamoto, N., et al., A novel Fc receptor for IgA and IgM is expressed on both hematopoietic and non-hematopoietic tissues. *Eur J Immunol*, 2001. 31(5): p. 1310-6.
155. Samaga, R., et al., The logic of EGFR/ErbB signaling: theoretical properties and analysis of high-throughput data. *PLoS Comput Biol*, 2009. 5(8): p. e1000438.
156. Sangeetha, S.R. and P.S. Appukuttan, IgA1 is the premier serum glycoprotein recognized by human galectin-1 since T antigen (Galbeta1-->3GalNAc-) is far superior to non-repeating N-acetyl lactosamine as ligand. *Int J Biol Macromol*, 2005. 35(5): p. 269-76.
157. Schlaeth, M., et al., Fc-engineered EGF-R antibodies mediate improved antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) against KRAS-mutated tumor cells. *Cancer Sci*.
158. Schneider-Merck, T., et al., Human IgG2 antibodies against epidermal growth factor receptor effectively trigger antibody-dependent cellular cytotoxicity but, in contrast to IgG1, only by cells of myeloid lineage. *J Immunol*. 184(1): p. 512-20.
159. Sebastian, S., et al., The complexity of targeting EGFR signalling in cancer: from expression to turnover. *Biochim Biophys Acta*, 2006. 1766(1): p. 120-39.
160. Snoeck, V., I.R. Peters, and E. Cox, The IgA system: a comparison of structure and function in different species. *Vet Res*, 2006. 37(3): p. 455-67.
161. Sorensen, V., et al., Structural requirements for incorporation of J chain into human IgM and IgA. *Int Immunol*, 2000. 12(1): p. 19-27.

162. Squarize, C.H., et al., Molecular cross-talk between the NFkappaB and STAT3 signaling pathways in head and neck squamous cell carcinoma. *Neoplasia*, 2006. 8(9): p. 733-46.
163. Stenberg, L., et al., Molecular characterization of protein Sir, a streptococcal cell surface protein that binds both immunoglobulin A and immunoglobulin G. *J Biol Chem*, 1994. 269(18): p. 13458-64.
164. Stockert, R.J., The asialoglycoprotein receptor: relationships between structure, function, and expression. *Physiol Rev*, 1995. 75(3): p. 591-609.
165. Stockert, R.J., et al., IgA interaction with the asialoglycoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1982. 79(20): p. 6229-31.
166. Suda, K., et al., EGFR T790M mutation: a double role in lung cancer cell survival? *J Thorac Oncol*, 2009. 4(1): p. 1-4.
167. Tamer, C.M., et al., Comparative studies of transcytosis and assembly of secretory IgA in Madin-Darby canine kidney cells expressing human polymeric Ig receptor. *J Immunol*, 1995. 155(2): p. 707-14.
168. Taylor, R.P., Of mice and mechanisms: identifying the role of complement in monoclonal antibody-based immunotherapy. *Haematologica*, 2006. 91(2): p. 146a.
169. Tomana, M., J.M. Epps, and J. Mestecky, Binding, uptake and processing of various molecular forms of IgA by human hepatoma cell line (HepG2). *Adv Exp Med Biol*, 1987. 216B: p. 1117-23.
170. Tsui, I.F., et al., Multiple pathways in the FGF signaling network are frequently deregulated by gene amplification in oral dysplasias. *Int J Cancer*, 2009. 125(9): p. 2219-28.
171. Tuma, P.L. and A.L. Hubbard, Transcytosis: crossing cellular barriers. *Physiol Rev*, 2003. 83(3): p. 871-932.
172. Valerius, T., et al., FcalphaRI (CD89) as a novel trigger molecule for bispecific antibody therapy. *Blood*, 1997. 90(11): p. 4485-92.
173. van Egmond, M., Neutrophils in antibody-based immunotherapy of cancer. *Expert Opin Biol Ther*, 2008. 8(1): p. 83-94.
174. van Egmond, M., et al., FcalphaRI-positive liver Kupffer cells: reappraisal of the function of immunoglobulin A in immunity. *Nat Med*, 2000. 6(6): p. 680-5.
175. van Egmond, M., et al., Enhancement of polymorphonuclear cell-mediated tumor cell killing on simultaneous engagement of fcgammaRI (CD64) and fcalphaRI (CD89). *Cancer Res*, 2001. 61(10): p. 4055-60.

176. Vidarsson, G., J.G. van de Winkel, and M.A. van Dijk, Multiplex screening for functionally rearranged immunoglobulin variable regions reveals expression of hybridoma-specific aberrant V-genes. *J Immunol Methods*, 2001. 249(1-2): p. 245-52.
177. Wallace, P.K., A.L. Howell, and M.W. Fanger, Role of Fc gamma receptors in cancer and infectious disease. *J Leukoc Biol*, 1994. 55(6): p. 816-26.
178. Weiner, L.M., et al., Dose and schedule study of panitumumab monotherapy in patients with advanced solid malignancies. *Clin Cancer Res*, 2008. 14(2): p. 502-8.
179. Weiner, L.M., M.V. Dhodapkar, and S. Ferrone, Monoclonal antibodies for cancer immunotherapy. *Lancet*, 2009. 373(9668): p. 1033-40.
180. Weisbart, R.H., et al., GM-CSF induces human neutrophil IgA-mediated phagocytosis by an IgA Fc receptor activation mechanism. *Nature*, 1988. 332(6165): p. 647-8.
181. Wells, A., EGF receptor. *Int J Biochem Cell Biol*, 1999. 31(6): p. 637-43.
182. Wendtner, C.M., et al., Consolidation with alemtuzumab in patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) in first remission--experience on safety and efficacy within a randomized multicenter phase III trial of the German CLL Study Group (GCLLSG). *Leukemia*, 2004. 18(6): p. 1093-101.
183. Wines, B.D. and P.M. Hogarth, IgA receptors in health and disease. *Tissue Antigens*, 2006. 68(2): p. 103-14.
184. Woof, J.M. and D.R. Burton, Human antibody-Fc receptor interactions illuminated by crystal structures. *Nat Rev Immunol*, 2004. 4(2): p. 89-99.
185. Woof, J.M. and M.A. Kerr, IgA function--variations on a theme. *Immunology*, 2004. 113(2): p. 175-7.
186. Woof, J.M. and M.A. Kerr, The function of immunoglobulin A in immunity. *J Pathol*, 2006. 208(2): p. 270-82.
187. Woof, J.M. and J. Mestecky, Mucosal immunoglobulins. *Immunol Rev*, 2005. 206: p. 64-82.
188. Wu, Y., et al., Mitogen-activated protein kinase-mediated phosphorylation of peroxiredoxin 6 regulates its phospholipase A(2) activity. *Biochem J*, 2009. 419(3): p. 669-79.
189. Wurm, F.M., Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat Biotechnol*, 2004. 22(11): p. 1393-8.
190. Yoo, E.M. and S.L. Morrison, IgA: an immune glycoprotein. *Clin Immunol*, 2005. 116(1): p. 3-10.

191. Zivkovic, M., et al., Oxidative burst and anticancer activities of rat neutrophils. Biofactors, 2005. 24(1-4): p. 305-12.

weitere Quellen:

192. Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M., (2002) "Immunologie" 5.Auflage, Spektrum Akademischer Verlag.

193. Boyle, P., and Levin, B., (2008), World Cancer Report, International Agency for Research on Cancer, Online Publication

194. European Cancer Observatorium, Bericht 2006

8. Anhang

8.1. Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Agar	Roth
Ampicillin	Roth
Bovine Serum Albumin Fraktion V	Roth
Capture Select Fab ahu-κ chromatographie media	CaptureSelect
Chromium ⁵¹	Hartmann Analytik
Destilliertes Wasser	Invitrogen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Eisessig	Merck
Ethanol	Roth
Ficoll-Plaque PLUS	GE Healthcare
Fötale Kälberserum (FCS)	Invitrogen
Geneticin	PAA
Glucose	Roth
Glycin	Roth
Glycerin	Merck
Hanks	PAA
Hefeextrakt	Roth
Hygromycin	PAA
Imidazol	Fluka
IS Mounting Medium	Dianova
Kaliumchlorid (KCl)	Roth
Lipofectamine 2000	Invitrogen
L-Methionine sulfoximine (MSX)	Sigma-Aldrich
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Roth
Mausserum	Sigma
Methanol	Merck
Methotrexate	Sigma-Aldrich
Milchpulver	Roth
Natriumazid	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Roth
Optiphase Supermix	PerkinElmer
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	PAA
Percoll	Biochrome
Phenazine Methosulfat (PMS)	Promega
Plasmocin	Sigma-Aldrich
Puromycin	PAA
Salzsäure	Merck
SigmaFAST o-Phenylendiamine dihydrochloride (OPD)	Sigma-Aldrich
Tris	Roth
TritonX-100	Merck
Trypanblau	Sigma-Aldrich

Charakterisierung rekombinanter IgA-Antikörper gegen den EGFR
- Anhang -

Chemikalie	Hersteller
Trypsin-EDTA	Invitrogen
Trypton	Roth
Tween20	Merck
1xPBS	PAA
10xPBS	Invitrogen
3-(3,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium inner salt (MTS)	Promega
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Dianova

8.2. Verwendete Kits

Kit	Verwendung	Hersteller
Roti-Black-P	Silbernitratfärbungen	Roth
Bleach-Kit	Entfärbung von Silbergelelen	Roth
Dry Ease Mini Gel Drying System	Trocknung der Gele	Invitrogen
NativePAGE Novex Bis-Tris Gel System	Native 4-16% Bis-Tris-Gele	Invitrogen
X Cell Sure Lock System	3-8% Tris-Acetat-Gele	Invitrogen
NucleoBond Xtra Maxi Kit	Plasmidpräparation	Macherey-Nagel
EZ-label-kit	FITC-Markierung von Antikörpern	Pierce
HMW Gel Filtration Calibration Kit	Kalibrierung der Gelfiltration	GE Healthcare
Mycoalert Mycoplasma Detection Kit	Nachweis einer Mycoplasmen Kontamination	Lonza
BCA Protein Assay Kit	Proteinquantifizierung	Pierce
Experion Pro260 analysis Kit	Proteinquantifizierung, Reinheitsbestimmung	Bio-Rad
SuperSignal West Duro Extended Duration Substrate	Chemilumineszenz	Thermo Scientific

8.3. Verwendete Lösungen

Puffer	Zusammensetzung (Angaben pro 1 Liter)
1xTBS Puffer	10 mM Tris pH 7,5 150 mM NaCl
1xTBS-Tween Puffer (Waschpuffer 1)	20 mM Tris pH 7,5 500 mM NaCl 0,05 % Tween 20
1xTBS-Tween Puffer (Waschpuffer 2)	20 mM Tris-HCl pH 7,5 500 mM NaCl 0,4 % Tween 20
1xTBT-Tween/Triton Puffer (Waschpuffer 3)	20 mM Tris-HCl pH 7,5 500 mM NaCl 0,4 % Tween 20 4 % Triton X-100
Elutionspuffer ahu-κ Aufreinigung	0,1 M Glycin pH 2

Charakterisierung rekombinanter IgA-Antikörper gegen den EGFR
- Anhang -

Puffer	Zusammensetzung (Angaben pro 1 Liter)
Neutralisierungspuffer für ahu-k Aufreinigung	1 M Tris pH 8,9
Bindungspuffer IMAC-Aufreinigung	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 10 mM Imidazol pH 8
Elutionspuffer IMAC Aufreinigung	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 250 mM Imidazol pH 8
Elektrotransferpuffer (Anderson-Puffer)	6 g Tris 28,8 g Glycin 10 ml 10 % SDS-Lösung 200 ml Methanol
Entfärbungspuffer für PVDF-Membranen	
Puffer 1 (Entfärbung)	50 ml 5 M NaCl 14,4 ml Eisessig Auf 500 ml H ₂ O _d
Puffer 2 (Neutralisierung)	1,5 M Tris pH 7
LB-Medium	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl pH 7,5 nach Autoklavieren + 1,5 % Agar nach Abkühlen: + 100 µg/ml Ampicillin
SOC-Medium	20 g Trypton 5 g Hefeextrakt 0,5 g NaCl 10 ml KCl (20mM) Nach Autoklavieren: + 5 mM MgCl ₂ + 20 ml 1M Glucoselösung
5x Laemmli-Puffer	1650 µl 1M Tris pH 6,8 3438 µl 10%SDS 2500 µl Glycerin 0,62 mg Bromphenolblau Mit Aqua dest. Auf 10 ml Für den reduzierenden Puffer: + 2,3 µl Beta-Mercaptoethanol/100 µl Puffer
Percoll-Dichtegradienten	
70% Percoll	35 ml Percoll 15 ml 1xPBS
63% Percoll	31,5 ml Percoll 18,5 ml Hanks
FACS-Puffer (Waschpuffer)	1xPBS 1% BSA 0,01% Natriumazid

8.4. Verwendete Antikörper

Antikörper	Spezifität	Hersteller
Penta-His Antibody (mouse IgG1)	Penta-Histidin-Markierung	Quiagen
Monoclonal Anti-Secretory Component, Maus-IgG1	Humane sekretorische Komponente	Sigma
Mouse Anti-Human IgA1-FITC	Humane α 1 Kette	Beckman Coulter
Mouse Anti-Human IgA2-FITC	Humane α 2 Kette	Beckman Coulter
Polyclonal Rabbit Anti-Human IgA/FITC Rabbit F(ab') ₂	Humane α Kette	Dako
Monoclonal Antibody CD32-PE	Humanes CD32 (Fc γ RII)	Beckman Coulter
Monoclonal Antibody CD89-PE	Humanes CD89 (Fc α RI)	Beckman Coulter
Monoclonal Antibody CD16-FITC	Humanes CD16 (Fc γ RIII)	Beckman Coulter
Monoclonal Antibody CD64-FITC	Humanes CD64 (Fc γ RI)	Beckman Coulter
Anti-Human IgA (α -chain specific)-Peroxidase, antibody produced in goat	Humane α Kette	Sigma
Polyclonal Rabbit Anti-Human IgG/FITC Rabbit F(ab') ₂	Human γ Kette	Dako
Secretory Component Antibody (SPM217)	Humane Sekretorische Komponente	GeneTex
Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunglobulins HRP	Murine Immunglobuline	Dako
Polyclonal Rabbit Anti-Human C1q Complement/FITC	Humanes C1q	Dako
Polyclonal Rabbit Anti-Human C4c Complement/FITC	Humanes C4c	Dako
Goat Anti-Human- κ FITC Conjugate	Humane κ Kette	Caltac
Goat Anti-Human- κ	Humane κ Kette	Caltac
Goat Anti-Human- κ Light Chain-HRP	Humane κ Kette	Biozol
FITC-conjugated Goat-Anti-Mouse-IgG/IgM	Murine IgG und IgM Immunglobuline	Dianova
003/005/018	Humaner IgG1 gegen humanes EGF-R	Genmab
Rituximab (Mabthera)	Humanes CD20	Hoffmann-La Roche
HuMab-KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin	Genmab
Matuzumab	Humanisierter IgG1 gegen humanes EGF-R	Merck
human myeloma IgA1	-	Biodesign
human myeloma IgA2	-	Biodesign
Human Colostrum (Sekretorisches IgA)	-	Sigma
Muriner Matuzumab (m425)	Muriner IgG1 Humanes EGF-R	Im Labor vorhanden
Muriner Cetuximab (m225)	Muriner IgG1 Humanes EGF-R	Im Labor vorhanden
Anti-Human IgG (Fc specific)-Peroxidase antibody produced in goat	Humane γ Kette	Sigma
225-scFv-Fc-S239D/A330L	Humanes EGF-R	Von M. Peipp zur Verfügung gestellt
225-scFv-Fc	Humanes EGF-R	

8.5. Verwendete Geräte, Säulen und Gebrauchsmaterialien

Gerät/Säule/Material	Verwendung	Hersteller
Miniperm roller bottle system	IgA Produktion	Greiner bio one
Celline CL1000 System	IgA Produktion	Sartorius
XK16 columns	Ahu-κ Affinitäts- chromatographie	GE Healthcare
Vivaspin 15 concentrators (100 kDa MWCO)	Aufkonzentration	Vivascience
Superdex 200 26/60 column	Größenausschluss- chromatographie	GE Healthcare
X Cell Sure Lock System	Gelelektrophorese	Invitrogen
AKTAprime liquid chromatography system	Aufreinigungen	GE Healthcare
Absorbance reader	ELISA-, BCA-Assay	Tecan, Groeding, Österreich
Experion automated electrophoresis system	Proteinquantifizierung, Reinheitsbestimmung	Bio-Rad
PVDF Membran	Elektrotransfer von Proteinen	GE Healthcare
Coulter EPICS XL-MCL Durchflusszytometer	Immunfluoreszenzen	Beckman Coulter
Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes, 10K MWCO, 0,5-3 ml Capacity	Dialyse vor und nach IMAC	Pierce
PowerPac HC Netzgerät	Gelelektrophorese	Bio-Rad
Cohsort E143 Netzgerät	Native Gelelektrophorese	VWR
1450 LSC MicroBeta TriLux	Szintillationsmessgerät	PerkinElmer
Molecular Imager ChemiDoc XRS+ System	Geldokumentation	Bio-Rad
Axio Imager 1.0 mit AxioCam MR	Immunologische Cytospin- Färbungen	Zeiss
Heraeus Multifuge 3S+	Zentrifuge (ADCC: Gradient, Überstände aus Bioreaktoren)	Thermo Scientific
Heraeus Megafuge 1.0R	Zentrifuge (ADCC/CDC: Waschschritte der chromierten Zellen, Platten, Durchflusszytometrische Analysen und CDC: Serum)	Thermo Scientific
Tissue Culture Plate 6-Well Flat Bottom with Lid	Transfektion CHO-Zellen	Sarstedt
10mm Petrischalen	Transfektion MDCK-Zellen	Sarstedt
Tissue Culture Plate 96-Well Flat Bottom Cell+/Suspension Cells	Einzelklongenerierung	Sarstedt
Microtiterplatten mit 96 Vertiefungen, V Form	Durchflusszytometrie	Sarstedt
Multiple Well Plate 96-Well, Round Bottom with Lid	ADCC, CDC	Sarstedt
Hybridomkulturflaschen	Kultivierung CHO-Zellen	Greiner bio one
8-Well Streifen Nunc Immunosorp™ Module	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dänemark
Gelloadertips	Beladung der Gele	Hartenstein
Transwell-Clear-Filter für 24 Well Platten, unbeschichtet	Transzytose	Costar

Charakterisierung rekombinanter IgA-Antikörper gegen den EGFR
- Anhang -

Gerät/Säule/Material	Verwendung	Hersteller
96-Well Sample Plate	Szintillationsmessung	Wallac, Turku, Finnland
TopSeal-A	Szintillationsmessung	PerkinElmer
MACS LS Separationssäulen	Monozytenpräparation	Milteny Biotec
MACS Preseparationsfilter	Monozytenpräparation	Milteny Biotec
Dialyseschlauch	Dialyse	Roth

8.6. Verwendete Software

Software	Verwendung	Hersteller
GraphPad Prism 4	Auswertung, Statistik	
Microsoft Office Paket 2003	Bildbearbeitung, schriftliche Darlegungen	Microsoft
XL-System II V3.0	FACS-Analysen	Beckman Coulter
Unicorn 4.11	HPLC	GE Healthcare
MicroBeta Windows Workstation	Szintillationsmessungen	Beckman Coulter
XFluor4	Absorbance Reader	Tecan
Quantity One	Geldokumentation	Bio-Rad
Endnote X1	Referenzen	Endnote
Vector NTI Advance 10.3	Vektorenkarten	Invitrogen

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
α	alpha
Abb	Abbildung
ADCC	antibody dependent cellular cytotoxicity
ahu	anti-human
AK	Antikörper
ASPGR	Asialoglykoproteinrezeptor
ATP	Adenosintriphosphat
ATCC	American Type Culture Collection
BCA	Bicinchoninsäure
BHK	Baby Hamster Kidney
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca	Calcium
CD	Cluster of Differentiation
CD-CHO	chemisch definiertes CHO-Medium
CDC	complement dependent cytotoxicity
cDNA	complementary DNA
C _H	konstante schwere Kette
CHO	Chinesische Hamsterovarien
C _L	variable schwere Kette
CL1000	Celline1000
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
d	Tag
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerin
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindole
dlgA	dimeres Immunglobulin A
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

Charakterisierung rekombinanter IgA-Antikörper gegen den EGFR
- Abkürzungsverzeichnis -

ECACC	European Collection of Cell Cultures
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ERK	extracellular regulated kinase
ERS	Electrical Resistance System
E:T	Effectorcell:Targetcell
Fab	Fragment antigen binding
FACS	fluorescence activated cell signalling
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fc	Fragment chrySTALLIZABLE
FCS	fetal calf serum
FcR	Fc-Rezeptor
g	Gramm
γ	gamma
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GS	Glutamine Synthetase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H	schwere Kette
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ O	Wasser
hCMV	Humanes Cytomegalie-Virus
HER	human epidermal receptor
HB-EGF	heparin-binding-epidermal growth factor
HRP	Horseradish-peroxidase
HMW	High Molecular Weight
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HygroB	Hygromycin B
ICA	Integral Cell Area
IFN	Interferon

Charakterisierung rekombinanter IgA-Antikörper gegen den EGFR
- Abkürzungsverzeichnis -

Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMAC	Immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie
IP ₃	Inositoltrisphosphat
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif
IRES	internal ribosomal entry site
J-Kette	Joining-Kette
κ	kappa
k	kilo
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
L	leichte Kette
LBD	Ligandenbindungsdomäne
LS	Large-scale separation
M	Molar
mM	Millimolar
mAB	monoclonal antibody
MAC	Membranangriffskomplex
MACS	Magnetic Cell Separation
MAP	Mitogen-aktivierte-Phosphokinase
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney
MEM	Minimum Essential Medium
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
mg	Milligramm
MIE	major immediate early
min	Minute
MMP	Magermilchpulver
ml	Milliliter
mV	Millivolt
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
MNC	mononuclear cells
MTS	3-(3,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium inner salt
MWCO	molecular weight cut off

Charakterisierung rekombinanter IgA-Antikörper gegen den EGFR
- Abkürzungsverzeichnis -

NaOH	Natriumhydroxid
Na ₂ H ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
N-Glykan	Stickstoff-Glykosylierung
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NRG	Neuregulin
Ω	Ohm
O ²⁻	Sauerstoffperoxid
OH ⁻	Hydroxidation
O-Glykan	Sauerstoff-Glykosylierung
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PARP	Poly-(ADP-ribose)-polymerase
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
pg	Pikogramm
pH	pondus Hydrogenii
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
pIgR	polymeres Immunglobulin-Rezeptor
PMS	Phenazine Methosulfat
PL	Phospholipase
POX	Peroxidase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PMN	polymorphonuclear leukocytes
RFI	relative Fluoreszenzintensität
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SC	secretory component
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sek	Sekunde
SIgA	sekretorisches Immunglobulin A
SPR	spezifische Produktionsrate

Charakterisierung rekombinanter IgA-Antikörper gegen den EGFR
- Abkürzungsverzeichnis -

SH	Src-homologe
STAT	Signaltransduktoren-und-Aktivatoren-der-Transkription
SV	Simian Virus
Szi	Szinitillation
TER	Transepithelial Resistance
TGF	Tumor Growth Factor
Tfr	Transferrin-Rezeptor
TK	Tyrosinkinase
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
U	Umdrehungen
UV	Ultraviolett
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
V _L	variable leichte Kette
V _H	variable schwere Kette
z.B.	zum Beispiel

Publikationen

Lohse, S., Peipp, M., Beyer, T., Valerius, T., Dechant, M., (2010) "Impact of human IgA antibodies on complement-dependent cytotoxicity mediated by combinations of EGF-R directed antibodies." Archivum Immunologicae Therapiae Experimentalis (in press)

Beyer, T., S. Lohse, et al. (2009). "Serum-free production and purification of chimeric IgA antibodies." J Immunol Methods 346(1-2): 26-37.

Schlaeth M, Berger S, Derer S, Klausz K, Lohse S, Dechant M, Lazar GA, Schneider-Merck T, Peipp M, Valerius T.. Fc engineered EGF-R antibodies mediate improved antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) against K-RAS mutated tumor cells. Cancer Science. 2010 Jan 20 (in press).

Schneider-Merck, T., J. J. Lammerts van Bueren, S. Berger, K. Rossen, P. H. C. van Berkel, S. Derer, T. Beyer, S. Lohse, W. Bleeker, M. Peipp, P. W. H. I. Parren, J. G. J. van de Winkel, T. Valerius, and M. Dechant. (2010) "Human IgG2 antibodies against epidermal growth factor receptor effectively trigger antibody-dependent cellular cytotoxicity but, in contrast to IgG1, only by cells of myeloid lineage." J Immunol 184(1): 512-20.

Poster

Lohse, S., Beyer, T., Peipp, M., Valerius, T., Dechant, M., (2009) "Production and Characterisation of recombinant IgA1 EGFR-antibodies." 32. Internationales Symposium der Norddeutschen Immunologen, Forschungszentrum Borstel, November-25, 2009

Buchkapitel

Beyer, T., Lohse, S., Dechant, M., Valerius, T., (2010) "Expression of IgAMolecules in Mammalian Cells", R. Kontermann and S. Dübel (eds.), Antibody Engineering, Chapter 30, DOI 10.1007/978-3-642-01144-3_30, # Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2010

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name: Diplom-Biologe Stefan Lohse
Geburtstag: 15.05.1981
Geburtsort: Saarbrücken, Saarland , Deutschland
Nationalität: Deutsch
Familienstand: ledig

Schulischer Werdegang

1987-1991 Grundschule Sitterswald
1991-2000 Willi-Graf-Gymnasium Saarbrücken

Wehrersatzdienst

2000-2001 Zivildienst beim Staatlichen Institut für Gesundheit und Umwelt

Studium

2001-2006 Studium der Human- und Molekularbiologie an der Universität des Saarlandes
Diplomprüfungen:
Genetik, Biochemie, Virologie und Immunologie
Diplomarbeit:
Analyse von Zielgenen der miRNAs in der *Dlk1/Gtl2*-Imprinting-Domäne
Betreuer: Prof. Dr. Jörg Walter (Lehrstuhl für Genetik)

Promotion

2007-2010 Promotion an der Christian-Albrecht-Universität Kiel
Thema: Charakterisierung rekombinanter IgA-Antikörper gegen den EGF-R
Betreuer:
Prof. Dr. Holger Kalthoff (Lehrstuhl für Onkologie)
Prof. Dr. Thomas C. Bosch (Lehrstuhl für Zoologie)

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass diese Dissertation – abgesehen von der Beratung durch meine akademischen Lehrer – nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist und die Arbeit unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden ist. Sie hat weder im Ganzen noch zum Teil an anderer Stelle im Rahmen eines Promotionsverfahrens vorgelegen. Ferner erkläre ich, dass ich noch keine früheren Promotionsversuche unternommen habe.

Für die mündliche Prüfung wird die Form der Disputation gewählt. Der Zulassung von Zuhörern/Zuhörerinnen bei der mündlichen Prüfung wird nicht widersprochen.

Kiel, (Stefan Lohse)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Menschen meinen Dank aussprechen, ohne deren Hilfe und Zutun diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Als erstem danke ich Herrn *Prof. Dr. Thomas Valerius* für die Möglichkeit, meine Promotion über dieses interessante Thema anfertigen zu können. Des Weiteren danke ich ihm für die hilfsbereite Betreuung und seinen wissenschaftlichen Rat.

Herrn *Prof. Dr. Thomas C. Bosch* und Herrn *Prof. Dr. Holger Kalthoff* danke ich für die Betreuung meiner Doktorarbeit.

Bei Herrn *Dr. Michael Dechant* bedanken ich mich für die stets gute und freundliche Betreuung in methodischen und wissenschaftlichen Fragestellungen.

Beiden möchte ich danken für die Hilfe beim Verfassen der Publikationen.

Den Herren *Dr. Thomas Beyer* und *Dr. Michael Dechant* danke ich für die Einführung in das Thema und in einige Methoden sowie die Bereitstellung der Transfektanden für IgA1 und IgA2 und des J-Kette-kodierenden Vektors.

Ich möchte darüber hinaus *Dr. Matthias Peipp*, *Dr. Matthias Staudinger*, *Dr. Tanja Schneider-Merck* und *Dr. Sven Berger* für die Geduld und Hilfe bei technischen Problemen und ihren wissenschaftlichen Rat danken.

Frau *Prof. Dr. Jenny Woof* und Frau *Prof. Dr. Charlotte Kaetzel* danke ich für die Bereitstellung des pIgR-Vektors und die Hilfe in technischen Fragen. Ohne sie wäre der Transzytosestest nicht möglich gewesen.

Frau *Dr. Katja Klausz* und Frau *Dr. Stefanie Derer* möchte ich herzlich danken für die Hilfsbereitschaft und die stets freundliche Bereitschaft zum Korrekturlesen.

Den technischen Assistentinnen, insbesondere *Christine Wildgrube*, möchte ich danken für die stete Hilfsbereitschaft und das Aufrechterhalten des Laborbetriebes.

Des Weiteren möchte ich meinen Mitstreiterinnen *Pia Glorius* und *Sahar Mohseni Nodeni* für die Diskussionsbereitschaft, das freundliche Arbeitsklima und die Hilfe in sachlichen Fragen danken.

Allen zusammen möchte ich für das angenehme und freundliche Arbeitsklima danken.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich persönlich nach ihren Kräften und Möglichkeiten in allen Lagen, besonders den schwierigen, unterstützt.