

Der Einfluss von CD55 auf die Komplementaktivierung durch einen IgG3 Antikörper gegen den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Thies Rösner

Kiel, 2015

Erster Gutachter:

Herr Prof. Dr Scheidig

Zweiter Gutachter:

Herr Prof. Dr. Valerius

Tag der Disputation:

21.05.2015

Zum Druck genehmigt:

Herr Prof. Dr. Duschl

(Dekan)

1	<u>EINLEITUNG</u>	1
1.1	DER EPIDERMAL WACHSTUMSFAKTOR-REZEPTOR ALS TUMORANTIGEN	1
1.1.1	ANTIKÖRPER IN DER IMMUNTHERAPIE	1
1.1.2	DIE EGF-REZEPTOR FAMILIE	2
1.1.3	SIGNALTRANSDUKTION DURCH DEN EGFR	3
1.1.4	DER EGFR IN DER TUMORGENESE	3
1.2	DER EGFR ALS ZIEL IN DER IMMUNTHERAPIE SOLIDER TUMORE	4
1.2.1	EGFR-GERICHTETE TYROSINKINASE-INHIBITOREN (TKI)	4
1.2.2	EGFR-GERICHTETE ANTIKÖRPER	5
1.3	EFFEKTORMECHANISMEN EGFR-GERICHTETER ANTIKÖRPER	6
1.3.1	ANTI-KÖRPER-ISOTYPEN UND STRUKTUR	6
1.3.2	FAB-VERMITTELTE EFFEKTE	8
1.3.3	FC-VERMITTELTE EFFEKTE	8
1.4	DAS KOMPLEMENTSYSTEM	10
1.4.1	INITIATION UND AMPLIFIKATION	11
1.4.2	REGULATION DER KOMPLEMENTAKTIVIERUNG	16
1.4.3	FUNKTIONEN DES KOMPLEMENTSYSTEMS IM IMMUNSYSTEM	18
1.4.4	DAS KOMPLEMENTSYSTEM IN DER TUMORGENESE	21
1.4.5	DAS KOMPLEMENTSYSTEMS IN DER ANTIKÖRPERBASIERTE IMMUNTHERAPIE	22
1.5	STRATEGIEN ZUR VERBESSERUNG DER KOMPLEMENTAKTIVIERUNG DURCH MAK	23
1.5.1	BLOCKADE UND HERUNTERREGULIERUNG VON <i>mCRPs</i>	23
1.5.2	MODIFIKATION DER C1Q-BINDUNG DURCH MUTATION DES FC-TEILS	24
1.5.3	ISOTYP-WECHSEL: IGG1 VS IGG3	25
2	<u>HYPOTHESEN UND ZIELE</u>	30
3	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	31
3.1	ETHIKVOTUM UND EINVERSTÄNDNIS DER SPENDER	31
3.2	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	31
3.2.1	KONSTRUKTION VON EXPRESSIONSVEKTOREN	31
3.2.2	GENERIERUNG VON ZELLTRANSFEKTANTEN	34
3.2.3	ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY	36
3.3	BIOCHEMISCHE METHODEN	37
3.3.1	AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE	37
3.3.2	GRÖßENAUSSCHLUSSCHROMATOGRAPHIE	38
3.3.3	PROTEINKONZENTRATIONSBESTIMMUNG	39
3.3.4	NATRIUMDODECYLSULFAT POLYACRYLAMID GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)	39
3.3.5	WESTERN BLOT	39
3.4	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	40
3.4.1	ZELLKULTUR	40
3.4.2	PRÄPARATION VON HUMANEM SERUM UND PLASMA	41
3.4.3	DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSEN	42
3.4.4	siRNA-VERMITTELTE HERUNTERREGULIERUNG VON CD46, CD55 UND CD59	45
3.4.5	ÜBEREXPRESSION VON CD55 UND CD59	46
3.4.6	ZELLVIABILITÄTSTEST	46
3.4.7	KOMPLEMENT-ABHÄNGIGE ZYTOTOXIZITÄT	46

4	<u>ERGEBNISSE</u>	50
4.1	PRODUKTION UND BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG VON REKOMBINANTEN ANTIKÖRPERN	50
4.1.1	GENERIERUNG DER EXPRESSIONSVEKTOREN	50
4.1.2	EXPRESSION VON EGFR-GERICHTETEN MÄK UND KONTROLL-MÄK IN CHO-K1-ZELLEN	53
4.1.3	REINIGUNG DER REKOMBINANTEN ANTIKÖRPER	54
4.1.4	REINHEITSANALYSE UND QUANTIFIZIERUNG DER ANTIKÖRPER	57
4.2	FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG DER GENERIERTEN ANTIKÖRPER	60
4.2.1	FAB-VERMITTELTE EFFEKTE	60
4.2.2	ANTI-EGFR-IG3 INDUZIERT KOMPLEMENTVERMITTELTE ZELLYSE	62
4.2.3	KOMPLEMENT ANLAGERUNG DURCH ANTI-EGFR-IGG1 UND -IGG3	65
4.2.4	FREISETZUNG VON ANAPHYLATOXINEN	69
4.3	EINFLUSS VON MEMBRANSTÄNDIGEN KOMPLEMENTREGULATOREN AUF DIE ANTI-EGFR-IGG3 INDUZIERTE KOMPLEMENTAKTIVIERUNG	71
4.3.1	siRNA-INDUZIERTE HERUNTERREGULIERUNG VON <i>mCRP</i>	71
4.3.2	ÜBEREXPRESSION VON CD55 UND CD59	77
4.3.3	ENDOGEN CD55 EXPRIMIERENDE ZELLLINIEN UND INDUKTION DES ALTERNATIVEN WEGS	82
5	<u>DISKUSSION</u>	83
5.1	EGFR-GERICHTETE ANTIKÖRPER UND KOMPLEMENTAKTIVIERUNG	83
5.2	AUSBILDUNG DER C3- UND C5-KONVERTASEN DURCH ANTI-EGFR-IGG3	84
5.3	DER EINFLUSS DER PUTATIVEN C4B BINDESTELLE IM IGG3-MOLEKÜL AUF KLASSISCHE KOMPLEMENTAKTIVIERUNG	86
5.4	DER EINFLUSS VON MEMBRANSTÄNDIGEN KOMPLEMENTREGULATOREN AUF DIE IGG3-INDUZIERTE KOMPLEMENTAKTIVIERUNG	88
5.5	DIE STELLUNG DES KOMPLEMENTSYSTEM IN DER IMMUNTHERAPIE	91
5.6	DAS THERAPEUTISCHE POTENTIAL VON IGG3-ANTI-KÖRPERN	92
5.7	ZUKÜNFTIGE VORHABEN	96
6	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	97
7	<u>SUMMARY</u>	99
8	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	100
9	<u>ANHANG</u>	112
9.1	MATERIAL	112
9.1.1	CHEMIKALIEN UND PUFFER	112
9.1.2	VERWENDETE GERÄTE	113
9.1.3	VERBRAUCHMATERIALIEN	114
9.1.4	VERWENDETE UND GENERIERTE VEKTOREN	114
9.1.5	VERWENDETE ZELLLINIEN	115
9.1.6	VERWENDETE SOFTWARE	115
9.1.7	VERWENDETE KITS UND REAGENZIEN	116
9.1.8	VERWENDETE PRIMER	116

9.1.9	VERWENDETE siRNA IN DER <i>MCRP</i> -HERUNTERREGULIERUNG	117
9.1.10	ZUSAMMENSETZUNG DER VERWENDETEN PUFFER	117
9.1.11	PRIMÄRE MONOKLONALE ANTIKÖRPER	118
9.1.12	SEKUNDÄRE ANTIKÖRPER	118
9.2	KOMPLEMENT-DEPOSITIONSEXPERIMENTE: DOTPLOTS UND HISTOGRAMME	119
9.2.1	ANLAGERUNG VON DER KOMPLEMENTKOMPONENTE C1q	119
9.2.2	ANLAGERUNG VON DER KOMPLEMENTKOMPONENTE C4b	120
9.2.3	ANLAGERUNG VON DER KOMPLEMENTKOMPONENTE C3b	121
9.2.4	ANLAGERUNG VON DER KOMPLEMENTKOMPONENTE FAKTOR Bb	122
9.2.5	ANLAGERUNG VON DER KOMPLEMENTKOMPONENTE C5b-9	123
9.3	SEQUENZIERUNGSDATEN	124
9.3.1	pEE 14.4.225-VL-KAPPA	124
9.3.2	pEE 14.4.225-VH-IGG1-WT	124
9.3.3	pEE 14.4.225-VH-IGG3-R435H	125
9.3.4	pEE 14.4.c2b8-VL-KAPPA	125
9.3.5	pEE 14.4.c2b8-VH-IGG1-WT	126
9.3.6	pEE 14.4.c2b8-VH-IGG3-R435H	126
10	<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>	<u>127</u>
11	<u>PUBLIKATIONEN</u>	<u>131</u>
12	<u>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG</u>	<u>132</u>
13	<u>CURRICULUM VITAE</u>	<u>133</u>
14	<u>DANKSAGUNG</u>	<u>135</u>

1 Einleitung

1.1 Der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor als Tumorantigen

1.1.1 Antikörper in der Immuntherapie

Im Jahr 2000 fassten Hanahan und Weinberg sechs unterschiedliche Bedingungen zusammen, welche während der Entstehung humaner Tumore auftreten. Zu den sogenannten „Hallmarks of Cancer“ zählen ununterbrochene Zellproliferation, Resistenz gegenüber Wachstumssuppressoren und Apoptose, Angiogenese, replikative Immortalität, Invasion und Metastasierung (Abbildung 1). Nachfolgend wurden noch zwei weitere Bedingungen in die „Hallmarks of Cancer“ aufgenommen: Neuprogrammierung des Metabolismus in malignen Zellen und Vermeidung der Zerstörung der Tumorzelle durch das Immunsystem. Diese Bedingungen werden durch zwei unterschiedliche Charakteristika ermöglicht. Zum einen bedingt eine Instabilität des Genoms, das sich in Zellen Mutationen und Chromosomenneuauordnungen ausbilden, welche in seltenen Fällen zur malignen Transformation führen können. Außerdem kann zum Beispiel auch eine (chronische) Entzündung die Tumorgenese induzieren, indem Immunzellen z.B. Wachstumsfaktoren ausschütten (Hanahan and Weinberg, 2011).

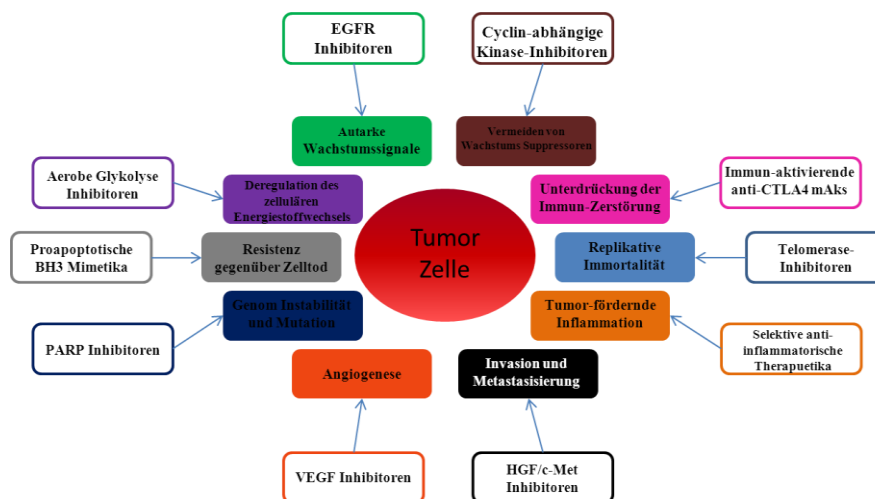


Abbildung 1. Die „Hallmarks of Cancer“. Dargestellt sind sowohl die „Hallmarks“ wie auch unterschiedliche therapeutische Ansätze zur Behandlung von Tumorerkrankungen (Hanahan and Weinberg, 2011)

Einleitung

Neben den konventionellen Säulen der Tumorthherapie - Operation, Bestrahlung, Chemotherapie - sind in den letzten Jahren mehrere Ansätze für eine zielgerichtete Tumorthherapie entwickelt und klinisch getestet worden (Abbildung 1). Diese neuen Medikamente können anhand ihres inhibierenden oder aktivierenden Effekts gegenüber den „Hallmarks“ kategorisiert werden. Zu diesen neuen Medikamenten zählen auch rekombinante monoklonale Antikörper (mAk). Momentan sind 13 verschiedene mAk zur Therapie von Krebserkrankungen zugelassen, zudem befindet sich eine große Zahl in klinischen Studien. Monoklonale Antikörper können zum Beispiel tumorassoziierte Antigene erkennen und die malignen Zellen mittels immunologischen Effektormechanismen eliminieren, wie es bei dem CD20-gerichteten mAk Rituximab der Fall ist. Des Weiteren werden mAk, wie der VEGF (engl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) gerichtete mAk Bevacizumab, zur Inhibition der Tumor-Angiogenese verwendet. Eine neue Generation mAk in der Tumorthherapie umfasst die sogenannten „Immune Checkpoint Inhibitors“. Diese neue Art der mAk übt ihre Wirkung aus, indem sie zentrale Mechanismen der Immunsuppression durch maligne Zellen inhibieren, zum Beispiel über die Blockade von inhibitorischen Rezeptoren auf Immunzellen. (Sliwkowski and Mellman, 2013).

Zielgerichtete Therapien solider Tumore gründen auf Forschungsergebnissen über die grundsätzlichen Veränderungen während der Genese von Tumoren, wie dem metastasierten kolorektalen Karzinom. Während dieser Arbeiten wurde der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (engl. *epidermal growth factor receptor*, EGFR) als Zielstruktur identifiziert und mAk generiert, welche den EGFR als Zielantigen erkennen (Mendelsohn, 2002).

1.1.2 Die EGF-Rezeptor Familie

Der EGFR gehört zur Familie der *ErbB*-Rezeptoren (engl. *Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog*; *ErbB*), dessen Mitglieder Wachstumsfaktoren darstellen. Diese Moleküle werden wiederum in die Klasse der Rezeptortyrosinkinasen eingeordnet. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Zelldifferenzierung, der Organmorphogenese und dem Zellüberleben. Zu der *ErbB*-Rezeptor-Familie zählen Her1 (auch als EGFR bezeichnet), Her2 (auch als Her2/neu), Her3 und Her4. Grundsätzlich bestehen die Mitglieder dieser Protein-Familie aus vier extrazellulären Domänen, wobei die extrazelluläre Domäne III die Ligandenbindung vermittelt. Des Weiteren bestehen die Mitglieder der EGFR-Familie aus einer transmembranären Domäne und einer intrazellulären Tyrosinkinasedomäne, welche die Signaltransduktion

Einleitung

vermittelt (Abbildung 2). Der Her3-Rezeptor stellt hierbei eine Ausnahme dar, da dieser keine intrazelluläre Tyrosinkinasedomäne aufweist (Schlessinger, 2002).

Für diese Rezeptoren existieren unterschiedliche Liganden, wobei die meisten für den EGFR beschrieben wurden. EGFR-Liganden sind unter anderem *EGF* (engl. *epidermal growth factor*, *EGF*) und *TGF α* (engl. *transforming growth factor α* , *TGF α*). Für Her2/neu wurde bislang kein Ligand identifiziert. (Harris et al., 2003).

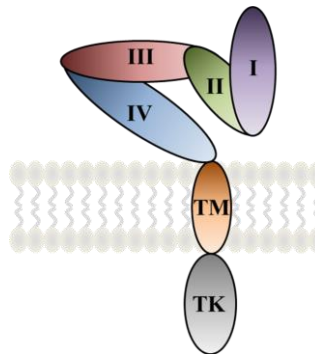


Abbildung 2. Schematische Darstellung des EGFRs. Dargestellt sind die extrazellulären, transmembranären und intrazellulären Domänen des EGFR. Strukturelle Ansicht der extrazellulären Domänen. Domäne 1 (I) ist in lila, Domäne 2 (II) in grün, Domäne 3 (III) in rot, Domäne 4 (IV) in blau, die transmembranäre Domäne in orange und die Tyrosinkinasedomäne (TK) in hellblau dargestellt.

1.1.3 Signaltransduktion durch den EGFR

Nach einer Liganden-induzierten Dimerisierung kommt es zur Rezeptoraktivierung, wobei die extrazellulären Domänen durch den Liganden von einer offenen in eine geschlossene Konformation überführt werden. Diese Konformationsänderung induziert daraufhin die Dimerisierung, so dass die intrazellulären Tyrosinkinasedomänen aktiviert und im folgendem die Tyrosinreste trans-autophosphoryliert werden. Die phosphorylierten Tyrosinreste ermöglichen es daraufhin, dass Proteine mit ihrer *SH2* (engl. *Src homology 2*, *SH2*)-Domäne binden können, so dass nachgeschaltete Signalwege aktiviert werden. Für die Ausbildung von Homo- oder Heterodimeren des EGFR ist die Aktivierung des Ras/ERK-, des PI3K/AKT- und des STAT-Signalweges beschrieben. Grundsätzlich führt die Aktivierung des EGFR zu Zellproliferation, Induktion von Apoptoseresistenz und Zellzyklusprogression (Citri and Yarden, 2006).

1.1.4 Der EGFR in der Tumorgenese

1980 wurde der EGFR als Wachstumsfaktorrezeptor beschrieben (Cohen et al., 1980). Im Folgenden kamen erste Hinweise auf, dass der EGFR von einigen Tumorzellarten bedingt durch eine Genamplifikation überexprimiert wird. Im weiteren Verlauf zeigte

Einleitung

sich, dass nahezu ein Drittel aller epithelialen Tumoren eine hohe EGFR-Expression aufweisen, die zum Teil mit einer schlechten Prognose korreliert. Als Konsequenz einer EGFR-Überexpression steigt die Anzahl von Homo- und Heterodimeren, so dass eine deregulierte Signaltransduktion erfolgt. Eine Überexpression des EGFR wird häufig bei epithelialen soliden Tumoren zum Beispiel des Kopf und Halses wie auch des Darms beobachtet. Neben einer Überexpression existieren noch weitere Möglichkeiten, wie eine Dysregulation der EGFR Expression in die Tumorgenese eingreifen kann. Die gleichzeitige Expression vom EGFR und seinem Liganden TGF α durch die Tumorzelle kann eine autokrine stimulierende Zellprogrammenschleife induzieren, welche die Tumorgenität erhöht. Ein weiterer Dysregulationmechanismus ist die Expression von mutierten EGFR-Varianten durch die Tumorzelle. Bei der am häufigsten auftretenden Mutation, welche auch als EGFRvIII bezeichnet wird, handelt es sich um eine verkürzte Version des EGFR-Wildtyps, so dass die intrazelluläre Tyrosinkinase konstitutiv Liganden-unabhängig aktiviert ist und so permanent die Signaltransduktionskaskade induziert. Eine EGFR-Dysregulation erfüllt demnach einen Großteil der von Hanahan und Weinberg beschriebenen „Hallmarks of Cancer“ und stellt daher ein geeignetes Ziel für eine Immuntherapie dar (Mendelsohn, 2002; Mendelsohn and Baselga, 2003).

1.2 Der EGFR als Ziel in der Immuntherapie solider Tumore

Für die zielgerichtete Behandlung EGFR-positiver Tumore sind heute zwei unterschiedliche Klassen von Medikamenten zugelassen. Zum einen stehen Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKIs) zum anderen monoklonale Antikörper (mAk) zur Verfügung.

1.2.1 EGFR-gerichtete Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI)

Der Wirkmechanismus der EGFR-gerichteten TKI beruht auf einer Konkurrenz mit ATP um die ATP-Bindestelle in der Tyrosinkinasedomäne des EGFR. TKI inhibieren demnach die Autophosphorylierung des EGFR und so auch die nachgeschaltete Signaltransduktion (Ciardiello and Tortora, 2008). Zu den EGFR-gerichteten TKI gehören sowohl reversible TKI Gefitinib und Erlotinib als auch der irreversible Afatinib (

Tabelle 1). TKI sind zugelassen zur Behandlung von nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen, wobei für die Behandlung mit Gefitinib eine Mutation im EGFR vorhanden sein muss. Diese Mutation bewirkt, dass die EGFR-Signaltransduktion

erhöht ist und so Gefitinib deutlich effizienter wirken kann (Ciardiello and Tortora, 2008).

Tabelle 1. Übersicht über klinische TKIs

TKI	EGFR Inhibition	Krankheit	Markenname	Hersteller
Gefitinib	Reversibel	nicht-Kleinzelliges Bronchialkarzinom mit aktivierender EGFR-Mutation	Iressa	AstraZeneca
Erlotinib	Reversibel	nicht-Kleinzelliges Bronchialkarzinom	Tarceva	Roche
Afatinib	Irreversibel	nicht-Kleinzelliges Bronchialkarzinom	Giotrif	Boehringer-Ingelheim

1.2.2 EGFR-gerichtete Antikörper

Heutzutage finden in der antikörperbasierten Tumorthherapie von EGFR-positiven soliden Tumoren verschiedene Antikörper Anwendung, wie zum Beispiel Cetuximab und Panitumumab (Tabelle 2). Der erste zugelassene EGFR-gerichtete mAk war Cetuximab, ein rekombinanter chimärer Antikörper vom IgG1-Isotyp (2006). In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass die zusätzliche Zugabe von Cetuximab zur Standardtherapie signifikant die Therapie bei Patienten mit metastasiertem kolorektalen Karzinom (engl. *metastatic colorectal carcinoma*, mCRC) verbessert (Van Cutsem et al., 2009). Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Behandlung von Patienten mit Kopf und Hals Tumoren erzielt (Vermorken et al., 2008). Zusätzlich konnte eine Studie zeigen, dass Cetuximab in Kombination mit Chemotherapie signifikant die Therapie von Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom verbessert (Pirker et al., 2009).

Tabelle 2. Übersicht über klinische EGFR-gerichtete Antikörper zur Tumorthherapie

Antikörper	Erkrankung	Name	Hersteller
Cetuximab	Metastasiertes Kolorektalkarzinom Epithelkarzinomen des Kopf und Halses	Erbitux	Merck
Panitumumab	Metastasiertes Kolorektalkarzinom	Vectibix	Amgen

Ein weiterer zugelassener EGFR-gerichteter mAk ist Panitumumab (Peeters et al., 2008). Hierbei handelt es sich um einen vollständig humanen Antikörper vom IgG2 Isotyp. Bei *mCRC* Patienten, welche eine Kombination von Chemotherapie und Panitumumab erhielten, verbesserte Panitumumab signifikant den Behandlungserfolg der Tumorerkrankung und ist daher für die Behandlung vom *mCRC* zugelassen (Douillard et al., 2010).

Sowohl für die Therapie mit Panitumumab als auch mit Cetuximab wurden diverse Biomarker identifiziert. Zu diesen Biomarkern zählen zum Beispiel aktivierende

Einleitung

Mutationen im *K-Ras* (engl. *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*, *K-RAS*) Gen oder die EGFR-Liganden *EGF* und *TGF α* . *K-Ras*-Mutationen bewirken, dass der EGFR-Signalweg konstitutiv aktiviert ist, so dass weder Cetuximab noch Panitumumab ein Ansprechen bei der Behandlung von *K-RAS* mutierten *mCRC* Patienten induzieren (Lièvre et al., 2008; Amado et al., 2008). Dies führte dazu, dass Cetuximab und Panitumumab nur für die Behandlung von *K-RAS*-wt Tumoren verwendet werden (Allegra et al., 2009). Des Weiteren konnte eine hohe EGFR Expression beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom als Tumorbiomarker identifiziert werden. Patienten, welche eine hohe EGFR-Expression aufwiesen, sprachen deutlich besser auf eine Therapie mit einer Kombination von Cetuximab und Chemotherapie an als Patienten mit einer geringen EGFR Expression (Pirker et al., 2012).

1.3 Effektormechanismen EGFR-gerichteter Antikörper

Im folgenden Abschnitt werden die möglichen Effektormechanismen von EGFR-gerichteten Antikörpern sowie deren grundsätzlicher Aufbau vorgestellt.

1.3.1 Antikörper-Isotypen und Struktur

Im humanen Organismus werden fünf verschiedene Antikörperisotypen exprimiert: IgG, IgM, IgD, IgA und IgE. Die verschiedenen Isotypen zeigen eine unterschiedliche Ausbildung ihrer Disulfidbrücken oder unterscheiden sich in der Anzahl der konstanten Domänen. Vom IgA und IgG existieren noch weitere Subklassen. So findet man für IgA zwei, IgA1 und IgA2, und für IgG vier Subklassen. Hierbei handelt es sich um IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4 (Vidarsson et al., 2014). Da im Fokus dieser Arbeit Antikörper vom IgG-Isotyp stehen, konzentriert sich die Einleitung im Folgenden auf diese Immunglobulinklasse.

Grundsätzlich bestehen Antikörper, aus zwei identischen leichten (engl. *light chain*, L; 25 kDa) und zwei schweren Ketten (engl. *heavy chain*, H; 50 kDa). In Abbildung 3 ist exemplarisch ein IgG1 Antikörper gezeigt. Dabei formen eine leichte und eine schwere Kette ein Heterodimer (*H1L1*). Mittels Disulfidbrücken setzen sich daraufhin ganze Antikörper bestehend aus *H2L2* zusammen. Die leichte Kette wiederum lässt sich in eine variable leichte (engl. *variable light domain*, VL) und eine konstante leichte Domäne (engl. *constant light domain*, CL) unterteilen. Die schwere Kette besteht aus einer variablen schweren Domäne (engl. *variable heavy domain*, VH) und drei unterschiedlichen konstanten Domänen (engl. *constant heavy domain*, CH1, CH2, CH3, exemplarisch für einen IgG1 Antikörper), wobei der Abschnitt zwischen CH1 und CH2

Einleitung

als Gelenkregion oder *hinge* Region (engl. *hinge region*, *hinge*) bezeichnet wird. Des Weiteren lassen sich Antikörper in zwei unterschiedliche Fragmente unterteilen. Das Fab-Fragment (engl. *fragment of antigen binding*, Fab) besteht aus der variablen leichten (VL) und der variablen schweren (VH), sowie aus der konstanten leichten (CL) und der ersten konstanten schweren Domäne (CH1). Das Fc-Fragment (engl. *fragment crystallizable*, Fc) besteht aus den zweiten (CH2) und dritten (CH3) Domänen der schweren Ketten. Das Fab- und Fc-Fragment sind über die *hinge* Region miteinander verbunden.

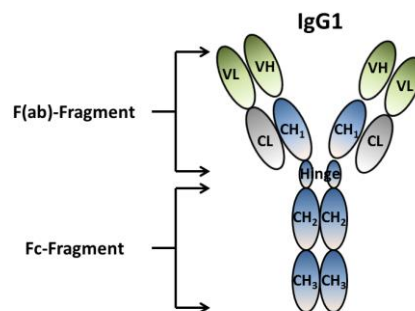


Abbildung 3. Schematische Darstellung eines IgG1-Antikörpers. In grün sind die variablen und in blau die konstanten Domänen gezeigt.

Obwohl die vier verschiedenen IgG-Isotypen zu 90% in ihrer Aminosäuresequenz identisch sind, ergeben sich trotzdem strukturelle Unterschiede. So unterscheiden sie sich vor allem in Bezug auf ihr Molekulargewicht, Aminosäuren der *hinge* Region und die Anzahl von Disulfidbrücken zwischen den schweren Ketten (Tabelle 3) (Vidarsson et al., 2014).

Tabelle 3. Eigenschaften der IgG-Isotypen

Isotyp	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Molekulargewicht (kDa)	150	150	170	150
Anzahl Aminosäuren in der <i>hinge</i> Region	15	12	62	12
Disulfidbrücken zwischen schweren Ketten	2	4	11	2

Wirkmechanismen therapeutischer EGFR-gerichteter mAbs in der Immuntherapie können konzeptionell in zwei unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden. Zum einen können Fab-vermittelte Effekte, zum anderen Fc-vermittelte Effekte induziert werden. Sowohl für die Fab- als auch für Fc-vermittelte Effekte wird vermutet, dass sie entscheidend zur therapeutischen Effizienz EGFR-gerichteter mAbs beitragen (Peipp et al., 2008).

1.3.2 Fab-vermittelte Effekte

EGFR-gerichtete Antikörper sind in der Lage, nach Antigenbindung direkte Fab-vermittelte Effekte zu induzieren. Hierzu zählen die Blockade der Ligandenbindung und die daraus resultierende Beeinträchtigung der Rezeptoraktivierung. Das Epitop von Cetuximab überlappt z.B. mit der Ligandenbindestelle von *EGF* und *TGF α* , so dass Cetuximab die Ligandenbindung verhindert und den Rezeptor demnach in einer inaktiven Form stabilisiert. Des Weiteren bedingt die Antigenbindung durch EGFR-gerichtete Antikörper, dass der EGFR internalisiert, so dass es zu einer verminderten Signaltransduktion durch diese Rezeptoren kommt. Zusätzlich zur Inhibition der Liganden konnte gezeigt werden, dass EGFR-gerichtete mAk zum Teil Apoptose in Karzinomzellen induzieren können. Des Weiteren wurde beobachtet, dass der EGFR-gerichtete mAk Cetuximab den Zellzyklusarrest bei Plattenepithelkarzinomzellen auslösen kann. Die Blockade des EGFR mittels mAk führte zudem zu einer verminderten Expression von angiogenen Faktoren, wie *VEGF*, und Matrix-Metalloproteinasen, so dass Tumorzelladhäsion und Metastasierung inhibiert werden (Peipp et al., 2008).

1.3.3 Fc-vermittelte Effekte

Mit ihrem Fc-Teil können Antikörper sowohl mit Rezeptoren auf Effektorzellen wie auch mit Serumproteinen interagieren und so indirekte Wirkmechanismen, wie antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität, Phagozytose und komplement-vermittelte Zytotoxizität induzieren (Dougan and Dranoff, 2009).

1.3.3.1 Antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität

Zur Induktion antikörperabhängiger zellvermittelter Zytotoxizität (engl. *antibody dependent cellular cytotoxicity*, ADCC) bedarf es einer Interaktion von Antigen-gebundenen Antikörpern mit Fc-Rezeptoren, im Falle der IgG-Immunglobuline mit Fc γ -Rezeptoren. IgG Antikörper können über die Fc γ -Rezeptoren natürliche Killerzellen, Monozyten und Granulozyten rekrutieren (Tabelle 4) (Bruhns et al., 2009). Nach Aktivierung durch den Antikörper schütten Granulozyten ihre Granula aus, natürliche Killerzellen setzen Perforine und Granzyme frei, welche im folgenden Caspasen spalten und damit Apoptose induzieren. Durch diese Mechanismen werden die Zielzellen zerstört (Cullen and Martin, 2008). Die Affinitäten der einzelnen IgG-Isotypen für Fc γ -Rezeptoren unterscheiden sich relativ stark voneinander, wobei grundsätzlich IgG1 und IgG3 deutlich effizienter an Fc γ -Rezeptoren binden als IgG2 und IgG4 (Tabelle 4).

Tabelle 4. Fcγ-Rezeptoren in der IgG-induzierten Rekrutierung von Effektorzellen
(Bruhns et al., 2009)

Fcγ-Rezeptor	Isoform	Spezifität zu IgG	Affinität	Vorkommen
FcγRI (CD64)	Fcγ1a	IgG1=3>4	Hoch	Monozyten, Makrophagen, DC Granulozyten (IFNγ, G-CSF)
FcγRII (CD32)	FcγIIa	IgG3≥1=2	Niedrig	Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, Plättchen, Langerhans Zellen
	FcγIIb	IgG3≥1>>2	Niedrig	Monozyten, Makrophagen, B Zellen
	FcγIIc	-----	Niedrig	Monozyten, Makrophagen, Neutrophile, B Zellen
FcγRIII (CD16)	FcγIIIa	IgG1=3>>>2=4	Mittel	Makrophagen, NK Zellen, γδT Zellen, manche Monozyten
	FcγIIIb	IgG1=3>>>2=4	Niedrig	Neutrophile Granulozyten

Die zugelassenen EGFR-gerichteten mAk Cetuximab und Panitumumab induzieren *in vitro* ADCC gegenüber EGFR-positiven Zellen (Peipp et al., 2008). Cetuximab vermittelt ADCC sowohl mit NK-Zellen als auch mit Granulozyten und Monozyten (Dechant et al., 2007), Panitumumab hingegen nur mit Granulozyten und Monozyten, aber kaum mit natürlichen Killerzellen (Schneider-Merck et al., 2010). Interessanterweise ist die Cetuximab-induzierte ADCC gegenüber *K-Ras* mutierten EGFR-positiven Tumorzellen *in vitro* deutlich eingeschränkt (Derer et al., 2012a). Derer et al. konnten zudem zeigen, dass die Cetuximab-vermittelte ADCC durch Granulozyten und Monozyten stark von der EGFR-Expressionsdichte auf den Tumorzellen abhängt ist. Die Zytotoxizität durch natürliche Killerzellen blieb jedoch weitestgehend unbeeinträchtigt (Derer et al., 2012b). In Mausmodellen konnte des Weiteren nachgewiesen werden, dass der Therapieerfolg von Cetuximab zum Teil abhängig von Fc-Rezeptor-vermittelten Effekten (ADCC) ist, da in Fc-Rezeptor-defizienten Mäusen kein Ansprechen auf eine Cetuximab Therapie mehr erfolgte (Yang et al., 2013). Zhang et al. konnten zudem zeigen, dass bestimmte Genpolymorphismen (131-H/R im Fcγ Rezeptor RIIa und 158-V/F im Fcγ Rezeptor RIIIa), welche die Bindungsaffinitäten zu Antikörper-Fc-Part beeinflussen, sich auf die klinische Effizienz von EGFR-gerichteten mAk auswirkten. Demnach scheinen sowohl Fc-vermittelte wie auch Fab-vermittelte Effekte eine wichtige Rolle bei der EGFR-gerichteten Therapie zu spielen (Peipp et al., 2008).

1.3.3.2 Komplementabhängige Zytotoxizität

Die Antikörper induzierte Aktivierung des Komplementsystems und die darauffolgende Elimination maligner Zellen durch Bestandteile des Komplementsystems wird als

Einleitung

komplementabhängige Zytotoxizität oder *CDC* (engl. *complement dependent cytotoxicity*, *CDC*) bezeichnet. Nach Aktivierung unterläuft das Komplementsystem eine Kaskade proteolytischer Spaltungen mit dem Ziel maligne Zellen zu eliminieren (Ricklin et al., 2010).

Im Gegensatz zu therapeutischen Antikörpern in der Behandlung von hämato-onkologischen Erkrankungen, wie Rituximab, induzieren therapeutische EGFR-gerichtete Antikörper, wie Cetuximab, *in vitro* keine Komplementaktivierung und dem entsprechend keine *CDC* gegenüber Tumorzellen, obwohl Cetuximab vom Isotyp her ein IgG1-Antikörper ist. IgG1-Antikörper rekrutieren normalerweise sehr effizient C1q und induzieren demnach *CDC* gegenüber Zielzellen. Dechant et. al. konnten jedoch zeigen, dass eine Kombination von zwei nicht-epitopüberlappenden EGFR-gerichteten Antikörpern in der Lage ist, komplementabhängig Tumorzellen zu lysieren. (Dechant et al., 2008). Des Weiteren konnten die Studien von Derer et al. zeigen, dass die *CDC* durch einen komplementoptimierten EGFR-gerichteten mAk stark abhängig von der EGFR-Expression auf der Zielzelle war (Derer et al., 2012b). Im Folgenden konnte zudem gezeigt werden, dass auch eine Kombination des EGFR-gerichteten mAk Zalutumumab mit einem EGFRvIII-gerichteten mAk (z.B. 13.1.2-IgG1) komplementvermittelte Lyse induzierte (Klausz et al., 2011). *In vivo* konnte im Gegensatz zu den *in vitro* Studien ein Beitrag des Komplementsystems zur therapeutischen Effizienz von Cetuximab gezeigt werden (Hsu et al., 2010).

1.4 Das Komplementsystem

Das Komplementsystem wurde 1896 von Jules Bordet erstmals als hitzelabiler Bestandteil des humanes Plasmas beschrieben, welcher die antibakterielle Wirkung der hitzestabilen Fraktion (zum Beispiel Antikörper) verstärkt und „komplementiert“ (Gengou, 1901). Weitere Studien zeigten, dass das Komplementsystem ein hochkonservierter Teil des angeborenen Immunsystems ist und einen wichtigen Beitrag zur Eliminierung von Pathogenen und malignen Zellen leistet. Das System besteht aus mehr als 30 verschiedenen Proteinkomponenten, welche sowohl gelöst im Plasma wie auch als membranständige Faktoren vorliegen. Nach seiner Aktivierung unterläuft das Komplementsystem eine Kaskade proteolytischer Spaltungen, welche die Detektion, Opsonisierung und Eliminierung von Pathogenen, apoptotischen wie auch malignen Zellen zur Folge haben (Ricklin et al., 2010).

1.4.1 Initiation und Amplifikation

Das Komplementsystem kann über drei unterschiedliche Wege initiiert werden: klassisch, Lektin-abhängig oder alternativ (Abbildung 4). Der klassische Weg (engl. *classical pathway, CP*) wird über eine Interaktion von antigengebundenen IgM oder IgG Antikörpern mit dem Serumprotein C1q aktiviert, demnach wird dieser Weg auch als der antikörperabhängige Komplementweg bezeichnet. Die Aktivierung des Lektinweges (engl. *lectin pathway, LP*) erfolgt über das mannosebindende Lektin (engl. *mannose binding lectin, MBL*). Hierbei handelt es sich um ein Strukturhomolog zu C1q, wobei *MBL* Zuckerreste wie Mannose auf Pathogenen und malignen Zellen erkennt. Interessanter Weise vermag *MBL*, auch Zuckerstrukturen innerhalb von Antikörpermolekülen zu binden, so dass auch mAk den *LP* induzieren können. Im Gegensatz zum *CP* und *LP* wird der alternative Weg (engl. *alternative pathway, AP*) des Komplementsystems nicht durch ein klassisches Initiatorprotein aktiviert. Bei der Initiation des *AP* kommt es zur spontanen Hydrolyse von C3, einem essentiellen Bestandteil der Komplementkaskade, zu C3(H₂O). Durch die Bildung von C3(H₂O) wird die Kaskade daraufhin initiiert. Unabhängig von der Art der Aktivierung lösen alle drei Wege des Komplementsystems dieselben Effektormechanismen aus. Hierzu zählen Detektion und Opsonisierung, sowie Elimination und Rekrutierung des angeborenen und adaptiven Immunsystems (Ricklin et al., 2010).

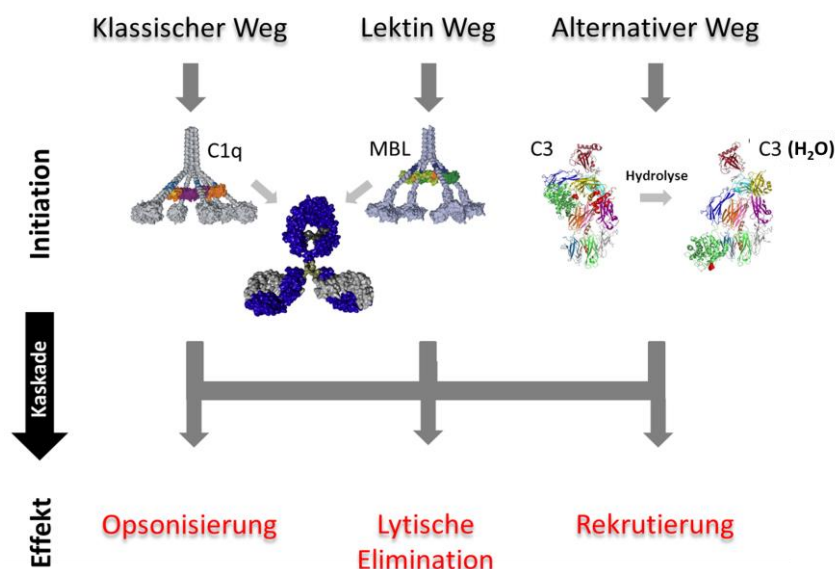


Abbildung 4. Darstellung der drei Wege der Komplementaktivierung. Abgebildet sind die Initiation des klassischen Weges (*CP*), des Lektinweges (*LP*) und des alternativen Weges (*AP*) der Komplementaktivierung

Einleitung

1.4.1.1 Der klassische Weg

Zur effektiven Induktion des *CP* und der daraus resultierenden komplementabhängigen Lyse von Pathogenen und Tumorzellen bedarf es einer Fixierung von C1q durch mindestens zwei Fc-Teile von Immunglobulinen (Borsos and Rapp, 1965). Die Bindung von C1q (Abbildung 5) an den Antikörper erfolgt in der CH₂-Domäne (Duncan and Winter, 1988) und wird durch verschiedene Faktoren, wie den Antikörperisotyp, die Antigenexpressionsdichte, das Antikörperepitop wie auch durch die Mobilität des Antigens in der Ziellmembran, beeinflusst (Derer et al., 2014a). Unter den humanen Antikörpern sind IgG1 und IgG3 wie auch IgM besonders effektiv in Bezug auf eine C1q Fixierung. Im Vergleich der verschiedenen IgG Isotypen ist IgG3 effizienter in der C1q Bindung als IgG1. IgG2 ist nur unter hohen Serumkonzentrationen und hohen Antigendichten in der Lage, C1q zu fixieren und die Komplementkaskade zu aktivieren. Grundsätzlich ist die C1q-Fixierung durch IgG Antikörper stark abhängig von der Antigenexpression, wobei Unterschiede zwischen den einzelnen Isotypen existieren. Im Gegensatz zu humanen IgG1, IgG2, IgG3 und IgM Isotypen sind Antikörper vom IgA, IgE oder IgD Isotyp nicht in der Lage C1q direkt zu binden, was auch für IgG4 gilt (Derer et al., 2014a).

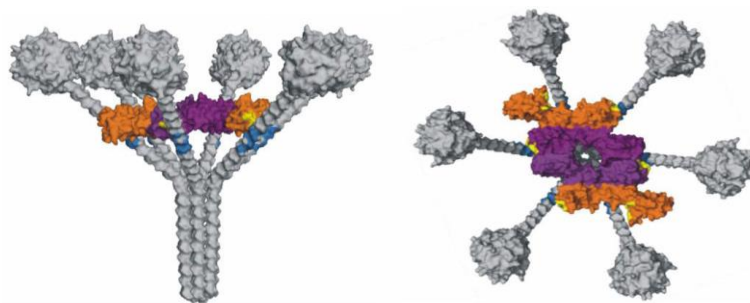


Abbildung 5. Struktur des C1-Komplexes des *CP*. In grau ist das C1q-Molekül in lila und orange die Serinproteasen C1s und C1r gezeigt. (Sim and Wallis, 2011)

Nach der Bindung von C1q an den Antikörper werden die C1q-gebundenen Serinproteasen C1r und C1s (Abbildung 5) autokatalytisch aktiviert, wobei sowohl die C1q-Bindung als auch die Aktivierung von C1s und C1r Kalzium-abhängig erfolgt (Müller-Eberhard, 1988).

C1r und C1s spalten daraufhin C4 und C2 (Abbildung 6) in ein großes (C4b, C2b) und ein kleines (C4a, C2a) Fragment. C4b und C2b lagern sich im nächsten Schritt auf der Membran des Pathogens oder der Tumorzelle ab und bilden zusammen die C3-Konvertase des *CP*, C4bC2b (Müller-Eberhard, 1988; Kerr, 1980). Dieses Molekül ist

Einleitung

daraufhin in der Lage, C3 in das Anaphylatoxin C3a und das Opsonin C3b zu spalten. Nach der Spaltung von C3 zu C3b wird eine interne Thioester-Gruppe freigesetzt, welche es dem C3b-Molekül ermöglicht, in räumlicher Nähe an Amino- und Hydroxyl-Gruppen von Proteinen, zum Beispiel des Antikörpers, zu binden. C3b interagiert im Folgenden mit der C3-Konvertase (C4bC2b) und bildet so die C5-Konvertase des CP, C4bC2bC3b (Müller-Eberhard, 1988).

Die C5-Konvertase spaltet daraufhin C5 wiederum in das Anaphylatoxin C5a und ein große Spaltprodukt C5b, welches entscheidend die Zusammenlagerung des terminalen Komplement Komplexes auf der Zielmembran katalysiert (Müller-Eberhard, 1988). Im nächsten Schritt bindet C6 an C5b, so dass der C5b-6-Komplex sich reversibel an der Zielzellmembran anlagern kann. C7 assoziiert daraufhin mit C5b-6 zu C5b-7, welches im Folgenden in die Membran inseriert. C5b-7 induziert anschließend die Insertion von C8 α und C8 β in die Membran. Im letzten Schritt der Zusammenlagerung des terminalen Komplementkomplexes bindet C9 an C8 α und bildet über Polymerisierung von bis zu dreizehn C9 Molekülen eine Pore aus, welche stabil in der Membran verankert ist. Der C5b-9 Komplex wird als Membran-Angriffs-Komplex oder MAC (engl. *membrane attack complex, MAC*) des Komplementsystems bezeichnet und induziert die Lyse der Zielzelle (Müller-Eberhard, 1988; Hadders et al., 2012).

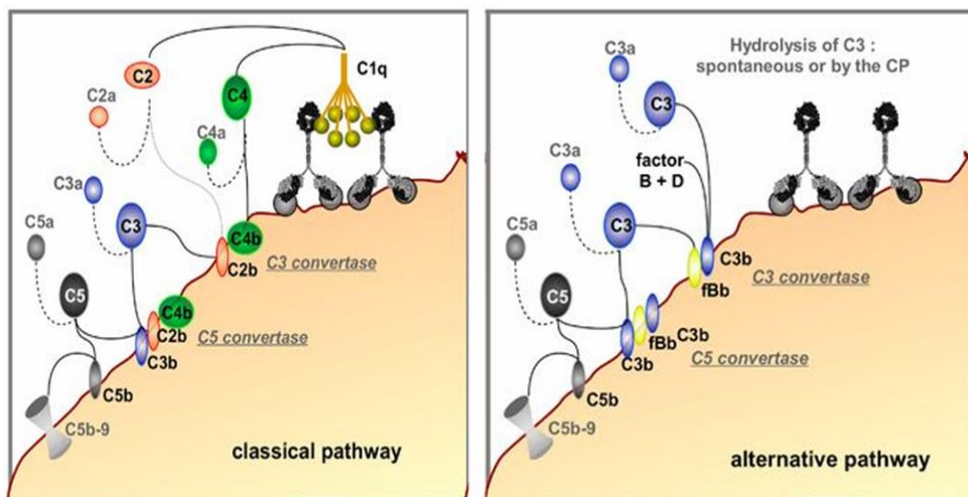


Abbildung 6. Komplementaktivierung durch CP und AP. Die Abbildungen entstammen Rösner et al., 2014.

1.4.1.2 Lektinweg

Im Gegensatz zur CP der Komplementaktivierung, wird der LP weitestgehend unabhängig von Immunglobulinen induziert. Zur Aktivierung bedarf er Muster-

Einleitung

Erkennungsrezeptoren oder *PRR* (engl. *pattern recognition receptors*, *PRR*), wie zum Beispiel des *MBL* oder Ficolinen. Mithilfe dieser Moleküle wird es möglich, Pathogen-assoziierte molekulare Muster oder *PAMP* (engl. *pathogen associated-molecular patterns*, *PAMP*) von eigenen Strukturen zu unterscheiden. Ähnlich dem C1q-Komplex des klassischen Weges ist auch das *MBL* des *LP* mit Serinproteasen assoziiert, den *MBL*-assoziierten Serinproteasen-1 und -2 (engl. *MBL associated serin protease-1 or -2*, *MASP*) (Abbildung 7) (Fujita et al., 2004).

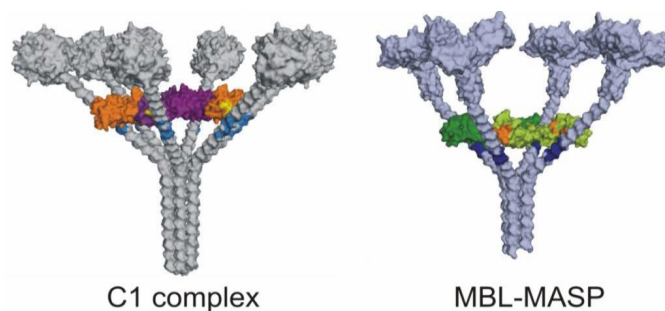


Abbildung 7. Struktureller Vergleich des C1-Komplexes des *CP* mit dem *MBL*-*MASP*-Komplex des *LP*. Das C1q/*MBL*-Molekül ist in grau, die Serinproteasen C1s und C1r, bzw. *MASP*-1 und *MASP*-2 sind in lila und orange dargestellt. (Wallis et al., 2010)

Diese *MASP*-1 und *MASP*-2 Moleküle sind funktionell ähnlich den C1s und C1r Serinproteasen des C1-Komplexes, unterscheiden sich jedoch in ihrer Struktur. Nachdem *MBL* seine Zielstruktur gebunden hat, werden *MASP*-1 und *MASP*-2 aktiviert, welche dann ihrerseits wiederum C4 und C2 spalten, so dass sich im *LP* die gleiche C3-Konvertase wie im *CP* ausbildet. Die nachfolgende Kaskade ist im *LP* identisch mit dem *CP* der Komplementaktivierung (Wallis et al., 2010).

1.4.1.3 Alternativer Weg

Der Mechanismus der alternativen Komplementaktivierung bzw. des *AP* (Abbildung 6) unterscheidet sich gravierend vom *CP* und *LP*. Dieser Weg wird initiiert durch eine spontane vorkommende Hydrolyse von C3 zu C3(H₂O). Dieser Mechanismus wird auch als „Tick-Over“ bezeichnet. C3(H₂O) beinhaltet, wie auch die aktive Form von C3 C3b, eine interne Thioester-Gruppe und wird im Folgenden von Faktor B gebunden. Der C3(H₂O)-gebundene Faktor B kann im nächsten Schritt durch die Serinprotease Faktor D gespalten werden, so dass sowohl das freie kleine Spaltprodukt Faktor Ba (FBa) als auch die initiale C3-Konvertase des *AP*, C3(H₂O)Faktor Bb (C3(H₂O)Bb), entsteht (Lachmann, 2009). Die initiale C3-Konvertase des *AP* ist nun in der Lage, weitere C3 Moleküle zu C3a und C3b zu spalten, ähnlich der C3-Konvertase des *CP* und *LP*

Einleitung

(C4bC2b). Die so generierten C3b Fragmente binden kovalent mit ihrem internen Thioester an Zelloberflächen oder Pathogene. Diese C3b-Moleküle werden nun wiederum von Faktor B gebunden, und Faktor B daraufhin durch Faktor D gespalten, so dass die eigentliche C3-Konvertase des AP, C3bFaktorBb (C3bBb), entsteht. Diese C3-Konvertase des AP kann von Faktor P (Properdin) gebunden und stabilisiert werden (Ricklin et al., 2010).

Die C3-Konvertasen des AP rekrutieren und spalten im Folgenden weiteres C3 zu C3b, so dass immer neue alternative C3-Konvertasen entstehen und es zu einer Amplifikation der alternativen Komplementaktivierung kommt (Abbildung 8). Diese Amplifikation kann zudem auch durch die klassischen C3-Konvertasen (C4bC2b) erfolgen, indem das gesplattene C3b nicht mit der klassischen C3-Konvertase interagiert, sondern von Faktor B gebunden und durch Faktor D aktiviert wird. Dementsprechend kommt es zu einer Verstärkung der klassisch initiierten Komplementaktivierung (Abbildung 8) (Harboe and Mollnes, 2008). In der Tat konnte gezeigt werden, dass 80 - 90 % der Komplementaktivierung, unabhängig von der Initiation, dem alternativen Weg zu geschrieben werden muss (Harboe et al., 2004; Harboe et al., 2009).

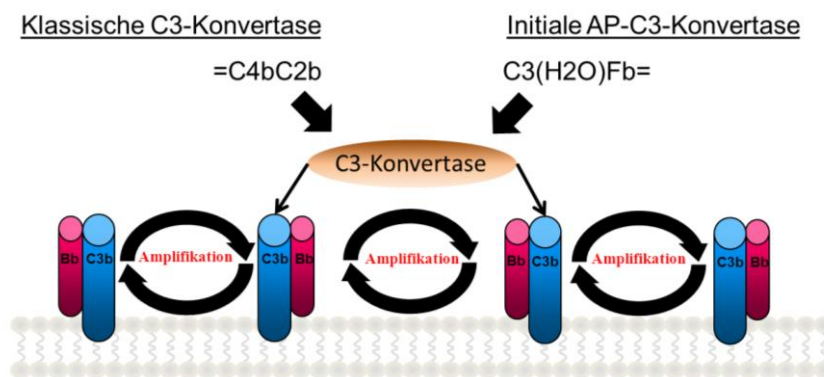


Abbildung 8. Die Amplifikation der Komplementaktivierung durch den AP

Die C3-Konvertase des AP fungiert jedoch nicht ausschließlich als Lieferant von neu generiertem C3b, sondern kann auch durch kovalente Bindung eines weiteren C3b Moleküls an die nicht katalytische alternative C3-Konvertase-Untereinheit ihre Affinität von C3 zu C5 ändern. Dem entsprechend erfolgt bei diesen neu gebildeten Konvertasen ein Wechsel der Substratsspezifität, von C3 zu C5. Diese neuen Konvertasen werden als C5-Konvertasen des AP bezeichnet und bestehen dann aus zwei Molekülen C3b und Faktor Bb (C3bBbC3b) (Abbildung 6). Trotz ihres unterschiedlichen strukturellen

Einleitung

Aufbaus katalysieren die alternativen C5-Konvertasen wie die klassischen C5-Konvertasen die Spaltung von C5 in C5b und C5a und induzieren so die terminale Komplementaktivierung, welche für alle drei Wege des Komplementsystems identisch ist (Abbildung 6) (Pangburn and Rawal, 2002).

Der AP ist nicht nur in der Lage, die antikörperinduzierte klassische Komplementaktivierung durch Amplifikation zu verstärken, sondern kann auch direkt durch Interaktion mit Antikörpern vom IgG-Isotyp initiiert werden. Bei dieser antikörperabhängigen Induktion des AP bedarf es der initialen Bildung von C3b, zum Beispiel durch Hydrolyse, in der fluiden Phase (Plasma). Das auf diese Weise generierte C3b weist eine hohe Affinität zu IgG-Molekülen auf und kann im Folgenden C3b₂-IgG Komplexe formen. Die C3b₂-IgG Komplexe schützen einerseits die C3b-Moleküle vor einer Inaktivierung durch lösliche Inhibitoren, zum Beispiel Faktor H. Andererseits ermöglichen sie, dass Properdin bivalent binden kann, so dass sich die C3-Konvertasen des alternativen Weges stabil ausbilden können. Im Gegensatz zu C1q, welches in der CH2-Domäne des IgG bindet, befindet sich die C3b Bindestelle in der CH1-Domäne des Antikörpers (Lutz and Jelezarova, 2006).

1.4.2 Regulation der Komplementaktivierung

Eine unkontrollierte Komplementaktivierung, insbesondere in Bezug auf die Amplifikation durch den alternativen Weg, kann folgenschwere Konsequenzen nach sich ziehen, wie zum Beispiel das atypische haemolytische uraemische Syndrom (engl. *atypical haemolytic uraemic syndrom*, aHUS). Daher existieren im humanen Organismus mindestens zwei unterschiedliche Arten von komplementregulatorischen Proteinen: lösliche und membranständige Regulatoren (Zipfel and Skerka, 2009).

1.4.2.1 Lösliche Komplement-Regulatoren

Zu den löslichen Komplementregulatoren zählt der C1-Inhibitor. Dieser Inhibitor verhindert die Aktivierung des CP, indem er nach antikörpervermittelter C1q-Bindung die aktivierten Serinproteasen C1s und C1r bindet und so die Spaltung von C4 und C2 verhindert. Ein weiteres lösliches inhibitorisches Molekül des CP ist das C4b-bindende Protein (engl. *C4b-binding protein*, C4bB), welches den Zerfall von klassischen C3-Konvertasen beschleunigt, indem es irreversibel C2b von C4b trennt (Zipfel and Skerka, 2009).

Der Komplementregulator Faktor H wird hauptsächlich als Regulator des AP angesehen, da Faktor H als Kofaktor für die Serinprotease Faktor I entscheidend an der

Einleitung

Spaltung von C3b, dem Initiator des *AP*, beteiligt ist. Hierbei wird aus dem aktiven C3b das inaktive Spaltprodukt iC3b. Des Weiteren kann Faktor H auch als Regulator des *CP* und *LP* fungieren, in dem er wiederum zusammen mit Faktor I die Spaltung von C4b zu C4c und C4d katalysiert und dem entsprechend den Zerfall der klassischen C3-Konvertase forciert (Zipfel and Skerka, 2009).

1.4.2.2 Membran-ständige Komplement-Regulatoren

Die Expression von membranständigen komplementregulatorischen Proteinen oder *mCRPs* (engl. *membrane-bound complement regulatory proteins, mCRPs*) schützt Zellen vor einer unkontrollierten Komplementaktivierung. Interessanterweise weisen maligne Zellen häufig eine Überexpression von *mCRPs* auf. Zu den *mCRPs* zählen CD35 (Komplementrezeptor Typ-1), CD46 (Membran Kofaktor Protein), CD55 (engl. *decay accelerating factor, DAF*) und CD59 (Protektin) (Fishelson et al., 2003).

CD46 ist ein membranständiges Glykoprotein, welches ubiquitär, ausgenommen Erythrozyten, exprimiert wird (Fishelson et al., 2003). CD46 kann sowohl C3b als auch C4b binden und bewirkt als Kofaktor für Faktor I die Degradation von C3b zu iC3b und von C4b zu C4c/C4d (Kojima et al., 1993). Der Wirkmechanismus von CD46 beruht einzig und allein auf der Degradation von C3b und C4b. CD46 ist nicht in der Lage den Zerfall von vollständig etablierten C3-Konvertasen zu induzieren oder zu beschleunigen. CD46 spielt hauptsächlich bei der Kontrolle des *AP* eine entscheidende Rolle. Interessanterweise stabilisiert CD46 in Abwesenheit von Faktor I die C3-Konvertasen des *AP* wie auch des *CP* (Seya and Atkinson, 1989).

CD55 ist ein GPI (Glycosylphosphatidylinositol, GPI)-verankertes membranständiges Glykoprotein, welches den Zerfall von C3- und C5-Konvertasen katalysiert (Nicholson-Weller and Wang, 1994), wobei hauptsächlich klassische Konvertasen von einer CD55-Regulation betroffen sind (Harris et al., 2007). CD55 zeigt eine sehr geringe Affinität zu naiven C3b und C4b, wobei die Affinität zu diesen Molekülen stark ansteigt, sobald die Konvertasen (C3- und C5-Konvertasen) vollständig ausgebildet wurden (Pangburn, 1986). Nach Bindung an die Konvertasen katalysiert CD55 den Zerfall dieser, indem entweder Faktor Bb im *AP* oder C2b im *CP* aus dem Konvertasen-Komplex heraus gelöst wird. CD55 muss jedoch zum Beispiel beide Komponenten der alternativen C3-Konvertasen, das heißt sowohl C3b als auch Faktor Bb binden, um den Zerfall dieser Konvertasen induzieren zu können. Nachdem die Konvertasen zerfallen sind, nimmt die Affinität von CD55 zu C3b und C4b wieder ab, so dass sich CD55 von diesen Molekülen lösen kann und „recycelt“ wird (Harris et al., 2007; Harris et al., 2005).

Einleitung

CD59 ist wie CD55 ein GPI-verankertes Glykoprotein, welches die terminale Komplementkomplexkomponente C8 binden kann. Mit dieser Bindung inhibiert CD59 die Polymerisierung von C9 und dem entsprechend die Ausbildung des *MAC* (Meri et al., 1990).

1.4.3 Funktionen des Komplementsystems im Immunsystem

Das Komplementsystem übernimmt innerhalb des Immunsystems unterschiedlichste Funktionen, welche weit über die lytische Elimination von Pathogenen, apoptotischen wie auch malignen Zellen hinausgehen. Das Komplementsystem stellt hierbei ein höchst effizientes Überwachungssystem dar, welches sowohl entscheidend bei der Elimination von infektiösen Partikeln mitwirkt als auch eine Immunantwort koordiniert und Gefahrensignale wahrnimmt und weiterleitet. Demnach ist das Komplement substantiell an der Aufrechterhaltung der körpereigenen Immunhomöostase beteiligt (Ricklin et al. 2010).

Auf Grund dieses immensen Aufgabenfeldes besitzt das Komplementsystem eine Vielzahl unterschiedlicher Funktionen. Neben der Eliminierung von Pathogenen ist das Komplementsystem bei der Beseitigung von apoptotischen Zellen und Immunkomplexen beteiligt, wobei es hierfür zu einer Interaktionen von löslichen *PRM* (engl. *pathogen recognition molecules*, PRM), wie C1q, Komplement induzierten Opsoninen, wie C4b oder C3b, und Komplementrezeptoren, wie den CR3 (engl. *complement receptor 3*, CR3), kommt (Trouw et al., 2008).

Des Weiteren interagiert das Komplementsystem mit anderen biologischen Systemen. Die Kooperation des Komplementsystems mit dem *TLR*-System (engl. *toll-like receptors*, TLR) bewirkt zum Beispiel eine effiziente Weiterleitung von Gefahrensignalen und koordiniert die Immunantwort des angeborenen Immunsystems (Hajishengallis and Lambris, 2010).

Ein weiterer Interaktionspartner des Komplementsystems stellt das Koagulationssystem dar. Das Komplementsystem amplifiziert hierbei die Koagulation und inhibiert die Fibrinolyse (Oikonomopoulou et al., 2012). Interessanterweise, kann auch das Koagulationssystem eine Komplementaktivierung amplifizieren, indem Faktor XII den *CP* aktiviert (Ghebrehiwet et al., 1981).

In der antikörperbasierten Immuntherapie kann eine Komplementaktivierung zwei unterschiedlichen Effektorfunktionen (Abbildung 9) zur Folge haben. Zum einen kann die Zielzelle direkt über den *MAC* des Komplementsystems lysiert werden. Zum anderen kommt es zu einer Interaktion vom Komplementsystem sowohl mit dem

Einleitung

angeborenen wie auch mit dem adaptiven Immunsystem. Die Interaktion vom Komplementsystem mit dem Immunsystem lässt sich wiederum in zwei unterschiedliche Wirkmechanismen gliedern: 1. Die Rekrutierung und Aktivierung von Immunzellen durch Anaphylatoxine und 2. die Aktivierung von Immunzellen und darauffolgende Initiation von Phagozytose und komplementabhängiger zellvermittelter Zytotoxizität oder *CDCC* (engl. *complement dependent cellular cytotoxicity*, *CDCC*) durch Opsonine (Derer et al., 2014a; Gelderman et al., 2004).

Wie schon in Abschnitt 1.4.1.1 beschrieben, induziert eine erfolgreich aktivierte Komplementkaskade die Insertion des *MAC* in die Membran der Zielzelle. Durch die Insertion des *MACs* wird die Integrität der Zellmembran gestört und lösliche extrazelluläre Faktoren, zum Beispiel Ca^{2+} , können ungehindert in die Zielzelle eindringen. Dieser Influx bewirkt in der Zielzelle eine Anhäufung von Ca^{2+} , so dass das mitochondriale Membranpotential zusammenbricht und eine Form des akuten Zelltodes (Nekrose) eintritt. Im Weiteren induziert der *MAC* morphologische Änderungen in der Zielzelle, welche charakteristisch für den programmierten Zelltod, die Apoptose, sind. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der *MAC*-induzierte Zelltod Caspasen-abhängig verläuft. Der *MAC*-induzierte Zelltod wird daher primär als nekrotisch und sekundär als apoptotisch angesehen. Zur effektiven Lyse von Zellen bedarf es in der Regel einer Vielzahl von *MAC*-induzierten Poren (Tegla et al., 2011).

Das Komplementsystem ist zudem in der Lage durch Anaphylatoxine zelluläre Komponenten des Immunsystems zu rekrutieren und zu aktivieren. Zu den Anaphylatoxinen zählen C3a und C5a, welche als kleine Spaltprodukte während der Komplementaktivierung gebildet werden. Die Anaphylatoxine binden nach ihrer Freisetzung an ihre Rezeptoren (zum Beispiel C5aR) auf lymphatischen (T- oder B-Zellen) oder myeloischen (Makrophagen oder Granulozyten) Effektorzellen. Nach Rezeptorbindung induzieren die Anaphylatoxine eine Vielzahl entzündungsfördernder Prozesse, wie zum Beispiel Chemotaxis und Aktivierung von Immunzellen, welche daraufhin zielgerichtet zum Ort der Komplementaktivierung wandern und die Ausbildung eines entzündungsfördernden Milieus bewirken. Unter den Anaphylatoxinen ist C5a der potenteste Mediator einer Entzündung. Die Inaktivierung der Anaphylatoxine ist von entscheidender Bedeutung, um den entzündungsfördernden Status einzudämmen. Daher werden die Anaphylatoxine mittels Serum-Carboxipeptidasen in ihre inaktivere Form, zum Beispiel C5a-desArg, umgesetzt.

Einleitung

Neben ihrer Funktion im Immunsystem spielen die Anaphylatoxine eine wichtige Rolle bei der Geweberegeneration und der Gehirnentwicklung (Klos et al., 2009).

Eine weitere Möglichkeit zur komplementabhängigen Induktion der zellulären Immunabwehr sind die Opsonine, welche während einer Komplementaktivierung entstehen und auf Pathogenen und malignen Zellen deponiert werden. Zu den Opsoninen zählen C3b oder iC3b, wie auch C1q und C4b. Sowohl lymphatische Zellen (NK-Zellen, B- T-Zellen) als auch myeloische Zellen (Monozyten, Makrophagen und Granulozyten) erkennen die deponierten Opsonine mittels Komplementrezeptoren, wie zum Beispiel CR3 oder CR4. Die Rezeptoren CR3 wie auch CR4 gehören zur Familie der Integrine und vermitteln die Phagozytose iC3b-opsonisierter Zellen durch Makrophagen und Neutrophile. Des Weiteren sind CR3 und CR4 an der Adhäsion und Stimulation von Immunzellen beteiligt (Dunkelberger and Song, 2010). Interessanterweise erhöht eine C5a-Stimulation die Expression von CR3 auf Granulozyten (Foreman et al., 1996). CR3 ist zudem in der Lage, *ADCC* zu verstärken oder *CDCC* zu induzieren. Hierbei binden die Effektorzellen mit ihren Fc-Rezeptoren tumorzellgebundene Antikörper und mit ihren CR3 Rezeptoren tumorzellosoziiertes iC3b. Die zusätzliche Interaktion von CR3 und iC3b führt zu einer erhöhten Adhäsion der Effektorzelle an die Tumorzelle, so dass *ADCC* verstärkt oder *CDCC* induziert wird. (Gelderman et al., 2004; Gelderman et al., 2006)

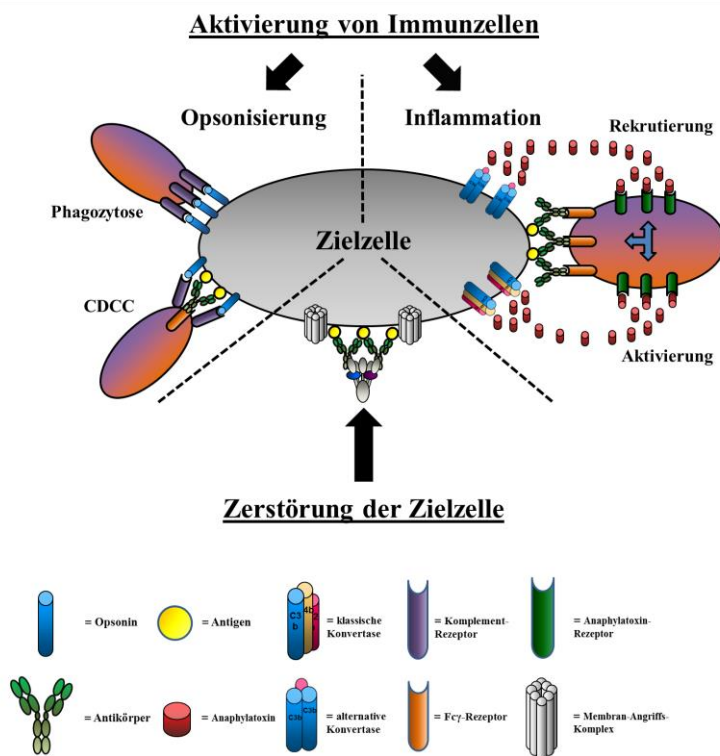


Abbildung 9. Interaktionen des Komplementsystems mit dem Immunsystem

1.4.4 Das Komplementsystem in der Tumorgenese

Diverse Studien konnten zeigen, dass eine verstärkte Komplementaktivierung, unabhängig von therapeutischen Antikörpern, in Patienten mit einer Tumorerkrankung vorliegt (Niculescu et al., 1992). Die Art der Komplementaktivierung wird kontrovers diskutiert und scheint sich innerhalb der verschiedenen Tumorentitäten zu unterscheiden. Unabhängig von der Art der Induktion, kann eine Komplementaktivierung auf zwei unterschiedliche Arten auf Tumorzellen wirken. Entweder fungiert das Komplementsystem als Kontrollsystem zur Inhibition der Tumorgenese oder als System zur Unterstützung der Tumorgenese (Abbildung 10) (Stover et al., 2010; Pio et al., 2013).

Die Überwachung der Tumorgenese durch das Komplementsystem erfolgt zum Beispiel über direkte Lyse der malignen Zellen durch den *MAC* oder durch C5a-induzierte Rekrutierung von Effektorzellen, welche daraufhin den Tumor infiltrieren und eine akute Inflammation auslösen. Des Weiteren kann eine Komplementaktivierung zu einer Opsonisierung maligner Zellen führen, so dass Phagozytose und Effektorzell-vermittelte Lyse induziert wird (Stover, 2010; Pio et al., 2013).

Neuere Studien konnten jedoch zeigen, dass eine Komplementaktivierung in der Tumorumgebung sich auch positiv auf das Tumorwachstum und die Tumorgenese auswirken kann (Stover, 2010; Pio et al., 2013). Markiewski et. al. konnten zeigen, dass in der Tumorumgebung generiertes C5a das Tumorwachstum fördert, indem die CD8(+)-T-Zell Antwort durch die Infiltration von *MDSCs* (engl. *myeloid-derived suppressor cells*, MDSC) unterbunden und ein chronisches entzündungsförderndes Milieu ausgebildet wird (Markiewski et al., 2008).

Des Weiteren kann das Komplementsystem positiven Einfluss auf die Tumor-Angiogenese nehmen. Dementsprechend erhöht sich die Aggressivität der Tumorerkrankung. Momentan wird für diesen Effekt hauptsächlich C5a verantwortlich gemacht, da es endotheliale Zellen aktiviert, so dass Gene hochreguliert werden, welche zum Beispiel in der Angiogenese involviert sind. (Albrecht et al., 2004).

Der *MAC* des Komplementsystems bedingt die Lyse der Zielzelle, wobei je nach Zelltyp eine gewisse Anzahl von *MAC*-induzierten Poren vorliegen muss. Wird diese Porendichte nicht erreicht, kommt es trotz der inserierten Poren zu keiner Zellyse, sondern zu einer Aktivierung der PI3K/AKT und ERK/RAS Signaltransduktionswege durch den *MAC*. Dieser nicht-lytische oder sublytische Komplementangriff induziert eine Zellzyklusprogression und fördert das Tumorwachstum (Vlaicu et al., 2013).

Einleitung

Tumorzellen schützen sich im Gegensatz zu normalen Zellen häufig mit einer Überexpression von CD59 vor einem lytischen Komplementangriff, so dass die CD59-Überexpression die Entstehung dieses sublytischen Komplementangriffs forciert und indirekt zum Tumorwachstum beiträgt (Yan et al., 2008).

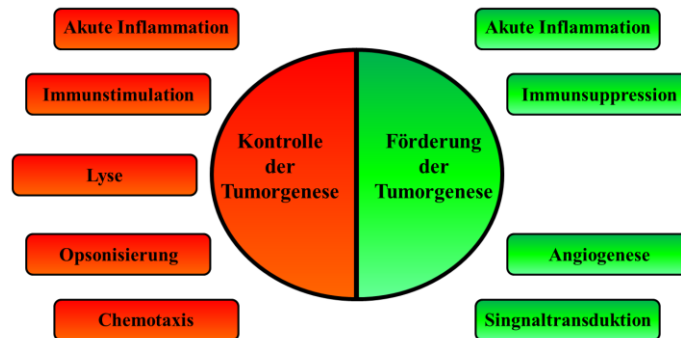


Abbildung 10. Die bidirektionale Rolle des Komplementsystems in der Tumorgenese
In rot sind Kontrollmechanismen des Komplementsystems in der Tumorgenese, in grün Tumorwachstums-fördernde Mechanismen durch das Komplementsystem dargestellt.
Abgewandelt nach Stover, 2010

1.4.5 Das Komplementsystems in der antikörperbasierten Immuntherapie

Viele therapeutische Antikörper, wie zum Beispiel die CD20-gerichteten mAk Rituximab und Ofatumumab, welche in der Therapie hämato-onkologischer Erkrankungen eingesetzt werden, können das Komplementsystem aktivieren und *in vitro* Tumorzellen durch die Generierung des MAC lysieren. Der Beitrag des Komplementsystems zum therapeutischen Erfolg von Rituximab wird jedoch kontrovers diskutiert. Zum einen kann nach Rituximab-Infusion ein Verbrauch der Komplementfaktoren detektiert werden, was auf eine Induktion der Komplementkaskade hindeutet (Glennie et al., 2007). Zum anderen korreliert das Auftreten des Allel A des C1qA(276A/G) Polymorphismus, welches mit verminderten C1q-Serum-Leveln einhergeht, mit einem besseren Ansprechen auf Rituximab (Racila et al., 2008). Interessanterweise ist der CD20-gerichtete mAk Ofatumumab deutlich effizienter in der Aktivierung des Komplementsystems als Rituximab unter Bedingungen, bei welchen das Antigen durch eine geringe Expression limitiert vorliegt. Daher wird der therapeutische Erfolg von Ofatumumab insbesondere der äußerst effizienten Komplementaktivierung zugeschrieben.

Wie bereits in 1.3.3.2. erwähnt finden sich auch therapeutische Antikörper, welche nach *in vitro* Analyse nicht in der Lage sind, das Komplementsystem zu aktivieren. Zu diesen

Einleitung

Antikörpern zählen vor allem die EGFR-gerichteten mAk Cetuximab wie auch Panitumumab (Dechant et al. 2008). Auf Grund der zentralen Rolle des Komplementsystems im Immunsystem und im Speziellen bei der Eliminierung maligner Zellen und Pathogenen wurden diverse Strategien zur Verbesserung der Komplementaktivierung durch mAk entwickelt. Diese werden im folgenden Abschnitt vorgestellt.

1.5 Strategien zur Verbesserung der Komplementaktivierung durch mAk

Die vielfältigen Strategien zur Verbesserung der Komplementaktivierung durch mAk beruhen auf vorausgegangenen Beobachtungen: Einige therapeutische Antikörper, wie zum Beispiel Cetuximab, sind nicht in der Lage, effizient das Komplementsystem zur Lyse von Tumorzellen zu aktivieren. Zusätzlich weisen Tumorzellen häufig eine Überexpression von membranständigen Komplementregulatoren auf, so dass eine Resistenz gegenüber der Antikörper-induzierten Komplementaktivierung besteht. Daher wurden folgende Strategien zur Verbesserung der Komplement-Aktivierung umgesetzt: Blockade und Herunterregulation der *mCRPs* auf Tumorzellen, Modifikation der C1q-Bindung durch Mutation des Fc-Teils (engl. *Fc-Engineering*) und Wechsel des Isotypens.

1.5.1 Blockade und Herunterregulierung von *mCRPs*

Wie in Abschnitt 1.4.2.2 beschrieben schützen sich normale wie auch maligne Zellen durch die Expression von *mCRPs* vor einer komplementabhängigen Lyse. Viele Tumorzellen zeigen zudem eine Überexpression der *mCRPs* (Yan et al., 2008; Shang et al., 2014). Daher wurden verschiedene Antikörper generiert, welche als Antigen entweder CD46, CD55 oder CD59 erkennen und deren inhibitorische Funktion blockieren. Die antikörpervermittelte Blockade der *mCRPs* verbesserte signifikant die Opsonisierung und die komplementvermittelte Lyse maligner Zellen durch tumorspezifische monoklonale Antikörper, sowohl *in vitro* (Gelderman et al., 2002; Harris et al., 1997) als auch *in vivo* (Macor et al., 2007). Die Ergebnisse müssen jedoch vorsichtig interpretiert werden, da die in diesen Studien verwendeten *mCRP*-blockierenden Antikörper auf Grund ihres Isotyps selbst in der Lage waren, das Komplementsystem zu aktivieren. Der häufig verwendete CD59-Antikörper MEM-43 ist vom Isotyp her ein muriner IgG2b und induziert dem entsprechend mit humanen Serum eine Komplementaktivierung.

Einleitung

Eine weitere Möglichkeit, die komplementinhibitorische Wirkung der *mCRPs* zu blockieren, ist die Herunterregulierung ihrer Expression durch spezifische siRNA (engl. *small interfering RNA*, siRNA) mittels des RNAi-Mechanismus (engl. *RNA-interference*, RNAi). Die Studien von Terui et al. zeigten, dass die siRNA-vermittelte Herunterregulierung von CD55 komplementresistente Tumorzellen für eine Rituximab-induzierte CDC sensibilisierte (Terui et al., 2006). Ähnliche Ergebnisse konnten auch für die Her2/neu gerichteten Antikörper Trastuzumab und Pertuzumab erzielt werden, welche als einzelne Antikörper ähnlich Cetuximab, nicht in der Lage sind komplementvermittelte Lyse gegenüber Her2/neu-positiven Zellen zu induzieren. Die Kombination von Pertuzumab/Trastuzumab und die simultane Herunterregulierung aller drei untersuchter *mCRPs* (CD46, CD55 und CD59) induzierte signifikant komplementvermittelte Lyse von Her2/neu positiven Zellen (Mamidi et al., 2013).

1.5.2 Modifikation der C1q-Bindung durch Mutation des Fc-Teils

Die Fähigkeit von Antikörpern des IgG-Isotyps, das Komplementsystem zu aktivieren, beruht auf der initialen Bindung von C1q an die CH2-Domäne des Antikörpers (Duncan and Winter, 1988). Daher wurden von Idusogie et al. Antikörpervarianten generiert, bei welchen Oberflächen exponierte Aminosäuren in der CH2-Domäne eines IgG1 über ortsspezifische Mutation ausgetauscht wurden. Mit Hilfe dieser Mutationsexperimente konnten die Aminosäuren Lysin in Position 326 (K326) und Glutamat in Position 333 (E333) im IgG1 als wichtige Mediatoren für die C1q-Bindung identifiziert werden (Idusogie et al., 2000). Des Weiteren wurde gezeigt, dass sowohl die einzelne als auch die gemeinsame Substitution von Lysin326 zu Tryptophan (K326W) und Glutamat333 zu Serin (E333S) zu einer erhöhten Anlagerung von C1q und zu einer verstärkten CDC durch den mutierten IgG1-Antikörper führte (Idusogie et al., 2001). Das Inserieren dieser Mutation sowohl in einen EGFR-gerichteten IgG1 als auch in einen EGFRvIII-gerichteten IgG1 bewirkte zudem, dass die Mutante im Gegensatz zum Wildtyp als einzelner EGFR- bzw. EGFRvIII-gerichteter Antikörper komplementvermittelte Lyse induzieren konnte (Derer et al., 2014b; Klausz et al. 2012).

Moore et al. identifizierten im Folgenden weitere Aminosäuren in der CH2-Domäne von IgG1-Antikörpern, welche an der C1q Bindung beteiligt sind. Hierbei handelte es sich um Serin in Position 267 (S267), Histidin in Position 268 (H268) und Serin in Position 324 (S324), wobei der einzelne Austausch von Serin267 zu Glutamat (S267E), Histidin268 zu Phenylalanin (H268F) oder Serin324 zu Threonin (S324T) mit einem signifikanten Anstieg der komplementvermittelten Lyse verbunden war. Zudem konnte

Einleitung

die Komplementaktivierung weiter verstärkt werden, wenn alle drei Aminosäuresubstitutionen simultan in die CH2-Domäne eingefügt wurden (Moore et al., 2010). Sowohl die von Idusogie als auch die von Moore beschriebenen doppel bzw. dreifach Mutationen bewirkten zwar einen Anstieg in der Fähigkeit des Antikörpers, komplementvermittelten Lyse zu induzieren, zugleich führten sie aber auch zu einer Abnahme der ADCC. Die doppelte Alanin-Substitution der von Idusogie beschriebenen Aminosäuren Lysin326 zu Alanin (K326A) und Glutamat333 zu Alanin (E333A) bewirkte, dass die Fähigkeit zur CDC weiterhin erhöht und die ADCC nicht negativ beeinflusst wurde (Idusogie et al., 2001). Die Fähigkeit zur ADCC der von Moore beschriebene dreifach Mutation S267E / H268F / S324T konnte durch zusätzliche Mutationen des Glycin in Position 236 zu Alanin (G236A) und Isoleucin in Position 332 zu Glutamat (I332E) bei gleichbleibender CDC wieder auf Wildtyp-Niveau angehoben werden (Moore et al., 2010). Im Gegensatz zur Modifikation der CH2-Domäne des Antikörpers konnte zudem gezeigt werden, dass Insertionen der Aminosäure Tryptophan in die *hinge* Region eines IgG1 dessen Fähigkeit zur C1q-Rekrutierung und komplementvermittelten Lyse steigern konnten (Dall'Acqua et al., 2006).

Eine weitere Möglichkeit des Fc-Engineering stellt die Generierung eines IgG1/IgG3 chimären Moleküls dar. Bei diesem Antikörper wurden die vollständigen CH2- und CH3-Domänen eines IgG1-Antikörpers gegen diejenigen eines IgG3-Antikörpers ausgetauscht. Das chimäre Molekül zeigte eine verbesserte Fähigkeit zur Komplementaktivierung und CDC im Vergleich mit den parentalen IgG1 und IgG3, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (Natsume et al., 2008).

Eine weitere Modifikation der C1q-Bindung durch Fc-Engineering zielte auf die Verstärkung des natürlichen Prozesses der Hexamisierung von IgG-Antikörpern nach Antigen-Bindung ab. Diese sogenannten „HexaBodies“ zeichneten sich durch eine Aminosäuresubstitution von Glutamat in Position 345 zu Arginin (E345R) aus. Die Substitution verbessert die Interaktion der Fc-Teile der IgG-Moleküle, so dass die natürlich auftretende Hexamisierung und dementsprechend die komplementvermittelte Lyse verstärkt wurde (Diebolder et al., 2014).

1.5.3 Isotyp-Wechsel: IgG1 vs IgG3

Neben dem IgG1 ist insbesondere der IgG3-Isotyp in der Lage das Komplementsystem zu aktivieren. So konnten Brüggemann et. al. wie auch Garred et al. zeigen, dass unter den humanen IgG-Isotypen IgG3-Antikörper am effektivsten C1q rekrutierten

Einleitung

(Brüggemann et al., 1987; Garred et al., 1989a). Des Weiteren induzierten Tumorantigen gerichtete mAk vom IgG3-Isotyp ebenso wie ihr IgG1 Gegenstück CDC gegenüber Tumorzellen. (Redpath et al., 1998; Olafsen et al., 1999).

Klassische Komplementaktivierung durch Antikörper des IgG-Isotyps erfordert die Bindung von C1q an die CH2-Domäne. Das putative C1q-Epizentrum in der CH2-Domäne umfasst die Aminosäuren Aspartat in Position 270, Lysin in Position 322, Prolin in Position 329 und Prolin in Position 331 (Idusogie et al., 2000). Trotz der großen Homologie zwischen IgG1 und IgG3 konnten Mutationsstudien der potentiellen C1q-Bindestelle zeigen, dass sich die C1q-Bindung zwischen IgG1 und IgG3 unterschied, so zum Beispiel im Leucin an Position 234, im Leucin an Position 235 und im Asparagin an Position 270. Eine Alanin Substitution an diesen Positionen führte bei IgG1 zur drastischen Abnahme der Komplementaktivierung, wo hingegen IgG3 nur moderat betroffen war (Michaelsen et al., 2009).

Neben der potentiell unterschiedlichen C1q-Bindungsstelle von IgG1 und IgG3 zeigten sich zwischen IgG1 und IgG3 auch strukturelle Unterschiede, insbesondere in Bezug auf die *hinge* Region (Michaelsen and Natvig, 1974) und die Disulfidbrücken zwischen den schweren Ketten (Abbildung 11). Die *hinge* Region besteht aus einem oberen, mittleren und unteren Abschnitt. Die obere *hinge* Region reicht vom N-Terminus der CH1-Domäne bis zum ersten Cystein der *hinge* Region, welches an der Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen den schweren Ketten beteiligt ist. Die mittlere *hinge* Region verläuft vom C-Terminus der oberen *hinge* Region bis zu dem Alanin an Position 231. Antikörper vom IgG1- und IgG3-Isotyp unterscheiden sich hier durch eine unterschiedliche Anzahl von Cysteinen (IgG1: $n_{\text{Cystein}} = 2$ und IgG3: $n_{\text{Cystein}} = 11$), welche Disulfidbrücken zwischen den schweren Ketten ausbilden können. Die untere *hinge* Region wird vom N-Terminus der CH2-Domäne gebildet. IgG1 und IgG3 unterscheiden sich sowohl in der oberen als auch in der mittleren *hinge* Region, die untere *hinge* Region ist bei beiden identisch (Tabelle 5).

Die mittlere *hinge* Region, welche beim IgG1 nur fünf Aminosäuren umfasst, besteht beim IgG3 je nach Allotyp aus bis zu 45 Aminosäuren. Daher können IgG3-Antikörper eine *hinge* Region von 62 Aminosäuren aufweisen, die IgG1 *hinge* Region ist lediglich 15 Aminosäuren lang. (Sandlie and Michaelsen, 1991; Brekke et al., 1995).

Da die *hinge* Region entscheidend an der Flexibilität von Antikörpermolekülen beteiligt ist (Dangl et al., 1988), ergibt sich daher auch für IgG1 und IgG3 eine unterschiedliche Flexibilität. So konnten die Studien von Roux et al. zeigen, dass Antikörper vom IgG3-

Einleitung

Isotyp im Vergleich mit den übrigen IgG-Isotypen eine viel größere Fab-Fab-Flexibilität besitzen. Die Hierarchie der Fab-Fab-Flexibilität ergibt sich wie folgt: IgG3 > IgG1 > IgG4 > IgG2. Die Analyse des mittleren Winkel von Fab zu Fab ergab für IgG3-Antikörper $\leq 136^\circ$. Der korrespondierende mittlere Winkel im IgG1-Antikörper lag hingegen nur bei $\leq 117^\circ$ (Roux et al., 1997).

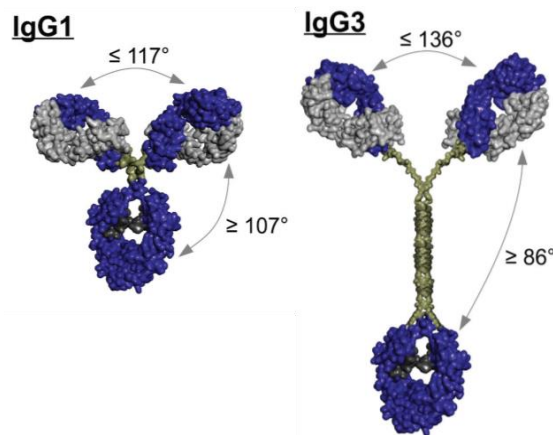


Abbildung 11. Struktureller Vergleich von IgG1 und IgG3. Die Abbildung entstammt Derer et al., 2014a.

Weitere Studien zur Flexibilität von Antikörpern des IgG3-Isotyps konnten daraufhin zeigen, dass die Länge der oberen *hinge* Region entscheidend für die Flexibilität des IgG3-Moleküls verantwortlich ist (Tabelle 5). Es zeigte sich, dass Deletionsmutanten von IgG3-Antikörpern, die keine obere *hinge* Region mehr besaßen (IgG3-15-15-15 und IgG3-15), deutliche Einschränkungen in Bezug auf ihre Fab-Fab-Flexibilität erfuhren. Die Analyse der mittleren Winkel von Fab zu Fab ergaben für die mutierten IgG3-Antikörper: $\leq 123^\circ$ für IgG3-15-15-15 und $\leq 119^\circ$ für IgG3-15. Dementsprechend lagen die Winkel nun im Bereich von Antikörpern des IgG1-Isotyps. Interessanterweise hatte eine Deletion der mittleren *hinge*-Exone keine Auswirkung auf die IgG3 Fab-Fab-Flexibilität.

Tabelle 5. IgG3 *hinge*-Deletionsmutanten im Vergleich mit IgG3 und IgG1 (Roux et al., 1998)

IgG-Isotyp	Hinge Region		
	obere	Mittlere	untere
IgG1	EPKSCDKTHT	CPPCP	APELLGGP
IgG3	ELKTPLGDTTHT	CPRCP(EPKSCDTPPPCPRCP) ₃	APELLGGP
IgG3-17-15-15	ELKTPLGDTTHT	CPRCP(EPKSCDTPPPCPRCP) ₂	APELLGGP
IgG3-17-15	ELKTPLGDTTHT	CPRCP(EPKSCDTPPPCPRCP) ₁	APELLGGP
IgG3-15-15-15	-----	CPRCP(EPKSCDTPPPCPRCP) ₃	APELLGGP
IgG3-15	-----	CPRCP(EPKSCDTPPPCPRCP) ₁	APELLGGP

1, 2, 3= Anzahl der *hinge*-Exon

Einleitung

Ein weiterer Unterschied zwischen IgG3 und IgG1 liegt in der Ausbildung der Disulfidbrücken zwischen leichter und schwerer Kette. Während im IgG1-Molekül das Cystein an Position 220 der oberen *hinge* Region der schweren Kette die Disulfidbrücke mit der leichten Ketten vermittelt, wird diese Verbindung im IgG3 durch das Cystein an Position 131 in der CH1-Domäne der schweren Kette vermittelt. Diese unterschiedliche Art der Disulfidbrücken bedingt zusätzlich eine erhöhte Flexibilität im IgG3-Molekül. (Roux et al., 1998). Interessanter weise konnte zudem gezeigt werden, dass ein IgG3-Molekül mit IgG1-ähnlichen Disulfidbrücken zwischen leichter und schwerer Kette nur noch eingeschränkt in der Lage war, *CDC* zu induzieren (Brekke et al., 1993).

Auf Grund dieser unterschiedlichen strukturellen Begebenheiten zwischen IgG1 und IgG3 ergibt sich auch ihr unterschiedliches Vermögen, *CDC* in Abhängigkeit der Antigenexpression zu induzieren. Sowohl Hapten-gerichtete IgG1 als auch IgG3 induzieren im gleichen Maße, *CDC* gegenüber Zellen, welche eine hohe Antigenexpression aufweisen (Abbildung 12) (Brüggemann et al., 1987; Michaelsen et al., 1991).

Hapten-gerichtete IgG3-Antikörper sind jedoch wesentlich effizienter in der Induktion der *CDC* gegenüber Zellen, welche eine geringe Antigenexpression besitzen (Michaelsen et al., 1991). Dieser Unterschied in der *CDC* zwischen IgG1 und IgG3 wird sowohl durch die längere *hinge* Region als auch durch die höhere Flexibilität des IgG3 bedingt. IgG3 ist demnach in der Lage unter Bedingungen, bei welchen das Zielantigen nur vereinzelt auf der Zelloberfläche vorliegt, mit Hilfe der längeren *hinge* Region und der höheren Flexibilität größere Abstände zwischen den Antigenen zu überspannen. Auf Grund der kürzeren *hinge* Region und der mangelnden Flexibilität gelingt dies IgG1 Molekülen hingegen nicht so effizient (Brekke et al., 1995).

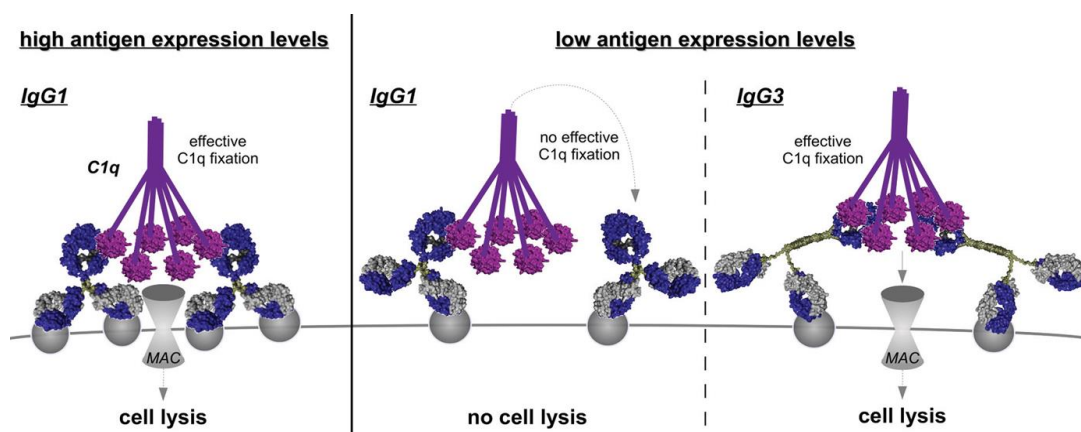


Abbildung 12. Model der *CDC*-Induktion durch IgG1 und IgG3. Die Abbildung entstammt Rösner et al., 2013.

Einleitung

Das Prinzip der antigendichteabhängigen Induktion der *CDC* durch IgG1 und IgG3 konnte mit Hilfe von CD20 gerichteten Antikörpern belegt werden. Aus früheren Studien war bekannt, dass der CD20-gerichtete therapeutische mAk Rituximab nicht in der Lage war, Tumorzellen mit Hilfe des Komplementsystems zu lysieren, falls die CD20-Antigendichte zu gering ausfiel (Teeling et al., 2004). Daher wurden Rituximab und dessen IgG3-Variante in ihrer Fähigkeit *CDC* gegenüber CD20-positiven Zellen zu induzieren, verglichen. Unter Bedingungen, bei welchen eine hohe CD20 Expression vorlag, waren beide mAk gleichermaßen in der Lage komplementabhängig die Zielzellen zu lysieren. Unter Verwendung von CD20-niedrig exprimierenden Zellen, z.B. chronisch lymphatischer Leukämie Zellen, induzierte nur noch der CD20-gerichtete-IgG3 Antikörper komplementvermittelte Lyse, Rituximab hingegen nicht (Rösner et al., 2013).

2 Hypothesen und Ziele

Auf Grund der zentralen Rolle im Immunsystem ist es für den therapeutischen Erfolg von monoklonalen Antikörpern von entscheidender Bedeutung, das Komplementsystem zur Abwehr maligner Zellen und Tumoren zu nutzen. Vor diesem Hintergrund konnten für die vorgelegte Arbeit folgende Hypothesen definiert werden:

- Die Aktivierung des Komplementsystems und die *CDC* durch monoklonale Antikörper kann die Effizienz einer Tumorthherapie steigern.
- Antikörper vom IgG3-Isotyp zeigen durch strukturelle Besonderheiten eine stärkere Bindung von C1q und können daher ein höheres Potential zur Aktivierung des Komplementsystems entwickeln als Antikörper vom IgG1-Isotyp.
- Da *mCRPs*, wie CD46, CD55 und C59 einen Einfluss auf das Ausmaß der Komplementaktivierung durch monoklonale Antikörper haben, können sie auch eine direkte Auswirkung auf den Mechanismus der antikörperinduzierten Komplementaktivierung ausüben.
- siRNA-vermittelte Inhibition oder Überexpression von *mCRPs* kann über den zugrundeliegenden Mechanismus der IgG3-induzierten Komplementaktivierung Aufschluss geben.

Anhand dieser aufgestellten Hypothesen wurden für die vorgelegte Arbeit folgende Ziele formuliert:

1. Generierung einer IgG3-Variante des therapeutischen EGFR-gerichteten Antikörpers Cetuximab
2. Vergleichende Charakterisierung von Cetuximab und der IgG3-Variante in Bezug auf die Komplementaktivierung
3. Analyse des Einflusses von zellulären Faktoren auf die IgG3-induzierte Komplementaktivierung mittels siRNA-Inhibition und Überexpression von *mCRPs*.

3 Material und Methoden

3.1 Ethikvotum und Einverständnis der Spender

Alle Experimente innerhalb dieser Arbeit wurden von der Ethikkommission der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki begutachtet. Die Blutspender wurden zufällig aus einer Gruppe von gesunden Freiwilligen ausgewählt, welche vor Analyse schriftlich ihr Einverständnis gegeben hatten.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Konstruktion von Expressionsvektoren

Zu Beginn dieser Arbeit lagen die variablen Regionen des EGFR-gerichteten Antikörpers c225, Cetuximab, in pEE14.4-Vektoren vor: die leichte Kette in pEE14.4.225VL-human-Kappa und die schwere Kette in pEE14.4-225VH-IgA2. Die schwerketten kodierenden Vektoren beinhalteten zudem einen IgA2-Fc-Teil, welcher durch ein Intron von der kodierenden Sequenz der variablen Region getrennt war. Mittels Computer-gestützter Verfahren wurden die Fc-Teile des IgG1 (NM_J00228) und des IgG3 (NM_J00231) generiert und der Firma Entelechon übermittelt, welche die Sequenzen *de novo* generierte und in den pEN08H-Vektor subklonierte. Des Weiteren lagen die variablen Regionen des Kontrollantikörpers c2B8 (Rituximab) vor Antritt dieser Arbeit bereits vor: die leichte Kette in pEE14.4-c2B8VL-Kappa und die schwere Kette in pEN08H-c2B8VH. Daher musste nur noch die variable Region der schweren Kette von C2B8 in den Zielvektor pEE14.4 kloniert werden.

3.2.1.1 Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau der Vektoren erfolgte mit folgenden Restriktionsenzymen: Im Falle der Klonierung der Fc-Teile wurden *NotI* (New England Biolabs, Ipswich, MS, USA) und *EcoRI* (New England Biolabs, Ipswich, MS, USA) genutzt. Im Falle der Klonierung der variablen Regionen wurden *HindIII* (New England Biolabs, Ipswich, MS, USA) und *NotI* verwendet. Die Restriktion verlief wie in Tabelle 6 und in Tabelle 7 gezeigt.

Tabelle 6. Restriktionsverdau für Fc-Klonierungen

Komponente	Insert Verdau => pENO8H [µl]	Vektor Verdau => pEE14.4 [µl]
A. bidest	2	7
10 x Puffer3	2	2
10 x BSA	2	2
NotI (20 U/µl)	2	2
EcoRI (20 U/µl)	2	2
DNA	10 (= 1 µg)	5 (= 10 µg)

pENO8H= pENO8H-Fc-IgG1/-Fc-IgG3; pEE14.4-= pEE14.4-225VH-IgA2

Tabelle 7. Restriktionsverdau für Klonierung der variablen Regionen

Komponente	Insert Verdau => pENO8H [µl]	Vektor Verdau => pEE14.4 [µl]
A. bidest	2	7
10 x Puffer3	2	2
10 x BSA	2	2
HindIII (20 U/µl)	2	2
NotI (20 U/µl)	2	2
DNA	10 (=1 µg)	5 (=10 µg)

pENO8H= pENO8H-VH-c2B8; pEE14.4-= pEE14.4-225VH-IgA2

Der Reaktionsmix wurde auf Eis pipettiert und im Anschluss im Wasserbad (Memmert, Schwabach, D) bei 37 °C für 2 Stunden inkubiert. Die jeweiligen Reaktionsgemische wurden im Anschluss elektrophoretisch in einem 1 % (w/v) Agarose -Gel aufgetragen. Mittels des Qiagen-Gelextraction-Kit (Qiagen, Venlo, NL) wurden nach Herstellerangaben sowohl die Inserts als auch die Vektoren präpariert.

3.2.1.2 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wurde genutzt, um DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufzutrennen. Die elektrophoretische Bewegung der DNA-Fragmente korreliert hierbei negativ mit der Anzahl der Basenpaare. Zur Herstellung der 1 % (w/v) Agarosegele wurde 1 g Agarose (Lonza Group Ltd., CH) mit 100 ml 1x TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat + 1 mM EDTA) aufgekocht. Nach der Polymerisierung wurde das Gel mit 1 x TAE-Puffer überschichtet und die DNA-Proben, sowie die Smart Ladder DNA-Leiter (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) als Marker aufgetragen. Die gelelektrophoretische Separation fand bei 80 V für 30 min (PowerPack HC™; Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) in der Wide Mini-Sub® Cell GT Elektrophoresekammer (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) statt. Nach der Separation wurde das Gel in einem Ethidiumbromid-Bad, bestehend aus 0,5 % v/v Ethidium-Bromid (Carl ROTH, Karlsruhe, D) in 1 x TAE-Puffer, für 10 min inkubiert.

Ethidium-Bromoid interkaliert in die DNA und ermöglichte es, die separierten Fragmente im UV-Licht unter Verwendung des HeroLab Transilluminator (HeroLAB; Wiesloch, D) zu detektieren.

3.2.1.3 Ligation

Nach dem Restriktionsverdau wurden die Inserts in die linearisierten Zielvektoren mittels einer Ligase-Reaktion integriert. Die Ligase (New England Biolabs, Ipswich, MS, USA) katalysiert die Ausbildung von Phosphodiesterbindungen zwischen freien 5'-Phosphat-Gruppen und freien 3'-Hydroxyl-Gruppen. Zur Ligation wurde ein molares Verhältnis von Vektor zu Insert von 3 zu 1 gewählt, da dies in Vorversuchen die höchste Ausbeute an ligierten Produkten ergab. Die Zusammensetzung der Ligation-Gemische ist in Tabelle 8 gezeigt. Die Ligation verlief bei 14 °C über Nacht.

Tabelle 8. Zusammensetzung der Ligationsansätze

Komponente	Insert: Fc-IgG1 / IgG3 Vektor: pEE14.4.225VH	Insert: c2B8-VH Vektor: pEE14.4.-IgA2
Ligationspuffer	2 µl	2 µl
Ligase	1 µl	1 µl
Insert	1 ng	0,4 ng
Vektor	19 ng	19 ng
A.bidest	ad 20 µl	ad 20 µl

3.2.1.4 Transformation der Vektoren

Die Transformation der Ligationsansätze erfolgte unter Verwendung von chemisch-kompetenten Mach-1 *Escherichia coli* Bakterien (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Nachdem die Bakterien auf Eis aufgetaut waren, wurden 25 µl Bakterien mit 1,5 µl des Ligationsansatzes für 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein Hitzeschock für 30 sek bei 42 °C, gefolgt von einer erneuten Inkubation für 2 min auf Eis. Daraufhin wurden die Zellen in vorgewärmten SOC-Medium (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) aufgenommen und für eine Stunde bei 37 °C unter kontinuierlichem Schütteln inkubiert. Schlussendlich wurden von der Bakteriensuspension 50 und 100 µl auf Ampicillin-haltigen (100 µg/ml Ampicillin, Carl ROTH, Karlsruhe, D) 2YT-Agar-Platten (Sarstedt, Nürnberg, D) mit einem sterilen Spatel ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.2.1.5 Analyse der Transfektanten

Standardmäßig wurden 10 Bakterienkolonien nach jeder Transformation einzeln gepickt und in 3 ml 2YT-Medium, supplementiert mit 100 µg/ml Ampicillin, überführt und über

Material und Methoden

Nacht bei ständigem Schütteln bei 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurde 1 ml der jeweiligen Bakteriensuspension bei 10.000 x g für 5 min abzentrifugiert. Mittels des Quiagen Miniprep-Spin Column-Kit (Quiagen, Venlo, NL) wurden nach Herstellerangaben die bakteriellen Plasmide präpariert. Die präparierten Vektoren wurden wiederum mittels Restriktionsenzymen (*NotI* und *EcoRI* im Falle einer Fc-IgG1/IgG3-Klonierung // *HindIII* und *NotI* im Falle einer Klonierung der variablen Region) für eine Stunde bei 37 °C verdaut. Die Testverdaue wurden im Anschluss mittels einer Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach der Analyse der Testverdaue wurden die Bakterienkolonien, welche einen erfolgreich ligierten Vektor enthielten, über Nacht in 200 ml 2YT-Medium, supplementiert mit 100 µg/ml Ampicillin, bei 37 °C angezogen. Am nächsten Tag wurden die erfolgreich ligierten Vektoren mit Hilfe des NucleoBond Xtra Maxi-Kits (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, D) nach Herstellerangaben präpariert.

3.2.1.6 Sequenzierung

Zur Verifikation einer erfolgreichen Klonierung wurden die Vektoren (pEE-14.4-225VH-IgG1 // pEE-14.4-225VH-IgG3 // pEE-14.4-c2B8VH-IgG1 // pEE-14.4-c2B8VH-IgG3) sequenziert. Hierbei wurden die präparierten Vektoren mit einem Sequenzierungsprimer versehen (Tabelle 9 und im Anhang Tabelle 26) und nach der Sanger-Methode im Institut für Klinische Molekularbiologie (UKSH; Kiel) sequenziert.

Tabelle 9. Zusammensetzung Sequenzierungsansatz

Komponente	Volumen	Konzentration
Vektor	3 µl	100 ng/ml
Primer	1 µl	4,8 pmol

3.2.2 Generierung von Zelltransfektanten

Zur Generierung der Zelltransfektanten wurden CHO-K1 (Lonza Group Ltd., CH) Zellen 24 Stunden vor Transfektion mit 0,05 % v/v Trypsin-EDTA abgelöst (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) und daraufhin 10⁶ Zellen in einer 10-cm-Platte (Sarstedt, Nürnberg, D) mit 10 ml Zellkulturmedium (DMEM, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen zweimal mit 1 x PBS (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) gewaschen und das Zellkulturmedium gewechselt, wobei nach dem Wechsel kein Penicillin und Streptomycin (beide Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) mehr vorhanden sein durfte, da die Antibiotika während der Transfektion toxisch auf die Zellen wirken könnten. Zur Transfektion

Material und Methoden

wurde die Vektor-DNA sowie die Transfektionsreagenz Lipofectamine® 2000 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) separat in Zellkulturmedium für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Detaillierte Angaben zur Zusammensetzung der einzelnen Ansätze sind in

Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10. Überblick über die Transfektionsansätze

DNA-Ansatz		Lipofectamine®-Ansatz	
Bestandteil	Menge	Bestandteil	Menge
Leicht-Ketten-Vektor	12 µg	Lipofectamine	40 µl
Schwer-Ketten-Vektor	12 µg		
DMEM w/o Glutamin	Ad 1500 µl	DMEM w/o Glutamin	1460 µl
Gesamtvolumen	1,5 ml	Gesamtvolumen	1,5 ml

Im Folgenden wurden beide Ansätze vereint und erneut für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Inkubationszeit bindet das Transfektionsreagenz die freie Vektor-DNA, so dass diese in die Zellen aufgenommen werden kann. Nach dieser erneuten Inkubation wurde das Vektor-Lipofectamine-Gemisch tropfenweise zu den Zellen gegeben. Nach einer Inkubation bei 37 °C und 5% CO₂ für 24 Stunden im Brutschrank wurde das Zellkulturmedium vollständig gegen das Selektionsmedium DMEM-select ausgetauscht. Die Zusammensetzung von DMEM-select ist in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11. Zusammensetzung DMEM-select

Bestandteil	Menge	Hersteller
DMEM w/o Glutamin	ad 500 ml	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Dialysiertes Hitze- inaktiviertes FCS	10 %	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Penizillin	100 U/ml	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Streptomycin	100 µg/ml	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Nicht-essentielle Aminosäuren (100x)	1 x	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Glutamat	6 µg/ml	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Asparagin	6 µg/ml	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Adenosin	7 µg/ml	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Guanosin	7 µg/ml	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Cytidin	7 µg/ml	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Uridin	7 µg/ml	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Thymidin	2,4 µg/ml	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

Material und Methoden

Als Selektionsdruck wurde daraufhin 50 μM Methioninsulfoximin (MSX, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) zu dem Zellkulturmedium hinzu gegeben. MSX inhibiert die endogene Expression der Glutamin-Synthase in Zellen, so dass nur noch Zellklone wachsen konnten, welche durch eine erfolgreiche Transfektion einen Expressionsvektor aufgenommen hatten. Die Expressionsvektoren beinhalteten neben dem gewünschten Zielgen zudem ein Glutamin-Synthase Minigen, welches es den Zellen ermöglichte, in Anwesenheit von MSX Glutamin zu synthetisieren. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurden CHO-K1 Zellen mit 1 μg eines Vektors, welcher für das Fluoreszenzprotein *GFP* (engl. *Green fluorescence protein*, *GFP*) kodierte, transfiziert und 48 Stunden nach Transfektion mittels Durchflusszytometrie analysiert. Hierbei fungierten nicht transfizierte CHO-K1 Zellen als Negativkontrolle.

Die CHO-K1 Zelltransfektanten verblieben für sechs Wochen in den 10-cm-Platten, wobei zweimal pro Woche das Zellkulturmedium und dem entsprechend der Selektionsdruck erneuert wurde. Zur Kontrolle einer erfolgreichen Selektion wurden auch nicht-transfizierte CHO-K1 Zellen mit MSX behandelt. In der 6. bis 8. Woche nach Transfektion traten die ersten Einzelzellklone auf und wurden daraufhin in 96-Well-Platten (Sarstedt, Nürnberg, D) überführt. Nach einer Phase des Anwachsens wurde die Hälfte der entstandenen Einzelzellklonmasse zur weiteren Anzucht in eine 6-Well-Platte (Sarstedt, Nürnberg, D) überführt. Die übrige Hälfte der Einzelzellklonmasse verblieb in der ursprünglichen 96-Well-Platte und wurde genutzt, um näherungsweise das Maß der Antikörperproduktion zu bestimmen. Nach einer Inkubation von zwei Tagen wurde der 96-Well-Platten-Überstand mittels ELISA (siehe 2.2.3) auf die Expression der Antikörper untersucht. Zur detaillierten Bestimmung der Klon-spezifischen Antikörperproduktionsraten wurde mittels MTS-Test (siehe 2.5.1) die Viabilität eines jeden Einzelklons im 96-Well-Format überprüft.

3.2.3 Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Die Bestimmung der Konzentrationen der Antikörper in den Überständen der Einzelzellklone wurde mittels eines klassischen Sandwich-*ELISA* (engl. *Enzyme linked immunosorbent assay*, *ELISA*) bestimmt. Zuerst wurden 8-Well-Streifen (Nunc Immunosorp, Roskilde, Danmark) für 24 Stunden mit 100 μl eines polyklonalen Ziege anti-humane Kappa-leicht Ketten Antikörpers (Abcam, Cambridge, UK) in einer 1:1000 Verdünnung in 1 x PBS bei 4 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Am nächsten Tag folgten drei Waschschrte mit einem Waschpuffer, bestehend aus 1 x PBS (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) supplementiert mit 0,05 % v/v Tween20 (Merck, Darmstadt, D). In jedes Well

Material und Methoden

wurden daraufhin im nächsten Schritt 300 µl eines blockierenden Puffers, bestehend aus 1 x PBS supplementiert mit 0,1 % v/w BSA (Carl ROTH, Karlsruhe, D) und 0,05 % v/v Tween20, gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde der blockierenden Puffer entfernt und von jedem zu untersuchenden Einzelzellklon 100 µl Zellkulturüberstand in die einzelnen Wells gegeben. Als Negativkontrolle fungierte Zellkulturüberstand von untransfizierten CHO-K1 Zellen. Danach folgte eine zweistündige Inkubation bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurden die Wells wiederum dreimal mit Waschpuffer gewaschen, gefolgt von der Detektion mit 100 µl polyklonalen HRP-konjugierten Ziege anti-humane IgG (H+L) Antikörpern (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), welche 1:2000 in 1 x PBS vorverdünnt worden waren. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper dauerte eine Stunde. Anschließend wurden ungebundene Antikörper durch intensives Waschen wiederum entfernt. Der nächste Schritt bestand in der Zugabe von 100 µl des Substrates (Sigma Fast OPD™, MSX, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Die Umsetzung des Substrates durch die Peroxidase dauerte circa 20 min, danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl 3 M Salzsäure (Carl ROTH, Karlsruhe, D) gestoppt. Die Absorption wurden im Sunrise™ Plate-Reader (Tecan Group Ltd. Männedorf, CH) bei 492 nm Wellenlänge und einer Referenzwellenlänge von 670 nm bestimmt.

3.3 Biochemische Methoden

3.3.1 Affinitätschromatographie

Im ersten Schritt der Aufreinigung der rekombinanten monoklonalen Antikörper wurde eine Affinitätschromatographie genutzt. Die affinitätschromatographische Aufreinigung der Antikörper aus Zellkulturüberständen erfolgte mittels der CaptureSelect Fab anti-humanen-Kappa-Leicht-Ketten Chromatographiematrix (CaptureSelect-Matrix, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Die CaptureSelect-Matrix bestand aus Sepharosekügelchen, welche mit Kamelantikörper-Fragmenten gegen die humane kappa-Leichtkette beschichtet waren. Die Zellkulturüberstände wurden bei 10.000 rpm für 45 min bei 4 °C abzentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0R, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA), mittels des vakuumbasierten Express™Plus-Systems (Merck, Darmstadt, D) steril-filtriert und anschließend der pH-Wert auf 8,5 eingestellt. Im Anschluss wurden die potentiell antikörperhaltigen Überstände mit der CaptureSelect-Matrix nach Herstellerangaben versehen. Die mit der CaptureSelect-Matrix-versetzten Überstände wurden unter ständigen Rühren über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am

folgenden Tag wurden die CaptureSelect-Matrix-haltigen Überstände bei 2.000 rpm und 4 °C für 20 min (Heraeus Megafuge 1.0R Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) abzentrifugiert, so dass der Überstand von der Matrix getrennt werden konnte. Die CaptureSelect-Matrix wurde im Anschluss auf eine Poly-Prep®-Chromatographie Tropfsäule (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) überführt und zweimal mit kaltem 1 x PBS gewaschen. Daraufhin erfolgte die Elution der Antikörper von der Matrix, in dem 5 ml eines 0,1 molaren Glycin-Puffers (pH 3) direkt auf die Matrix gegeben wurde. Das Eluat wurde in 5 ml Sarstedt-Röhrchen aufgefangen, welche 1 ml eines 1 M Tris-Puffers zur Neutralisierung des Glycin-Puffers enthielten.

Die Antikörperpräparationen wurden im nächsten Schritt mittels Vivaspin Säulen (Vivaspin 6 10000 MWCO Sartorius GmbH, Göttingen, D) durch Zentrifugation bei 2000 rpm und 4 °C für eine Stunde (Heraeus Megafuge 1.0R Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) auf 1 ml eingengt und mittels Dialyse-Kammern (Slid-A-Lyzer 10000 MWCO, Pierce Biotechnology, Waltham, MS, USA) nach Herstellerangaben gegen 1 x PBS bei 4 °C dialysiert.

3.3.2 Größenausschlusschromatographie

Im letzten Schritt der Aufreinigung wurden die Antikörperpräparationen mittels einer Gelfiltration analysiert und monomere Antikörper präpariert. Als Gelfiltrationssäule diente eine Superdex200 10 x 30 Säule (GE Healthcare, St Giles, UK), welche vor Inbetriebnahme mit dem Zweifachen des Säulenvolumens mit 1xPBS äquilibriert wurde. Zudem wurde das ÄKTAprime liquid Chromatography System (GE Healthcare, St Giles, UK) verwendet, welches es ermöglichte mittels der Unicorn 5.01 Software (GE Healthcare, St Giles, UK) kontinuierlich die UV-Absorption, den pH-Wert und die Konduktivität zu messen. Über eine 2 ml Schleife, dem sogenannten „Proben-Loop“, wurden die einzelnen Antikörperpräparationen manuell in das System eingeführt. Nachdem der „Proben-Loop“ mit 2 ml 1x PBS geleert und die Antikörperpräparation auf die Säule aufgetragen wurde, lief der Antikörper mit einer Flussrate von 0,5 ml/ml über die Säule. Die Fraktionierung erfolgte über Proteinbestimmung durch eine zwischen geschaltete UV Absorbptionsmessung bei 280 nm. Um bei dieser Gelfiltration die Proteingrößen abschätzen zu können, wurde in Vorversuchen mit einem HMW-Gelfiltration-Kalibrierungskit (GE Healthcare, St Giles, UK) die Säule geeicht. Hierbei wurden jeweils 500 µg des jeweiligen Proteins aufgetragen. Anhand der Elutionsprofile dieser Referenzproteine wurde das Laufverhalten der hergestellten Antikörper-

präparationen abgeschätzt. Mit Hilfe der Gelfiltration konnten monomere Antikörperpräparationen von polymeren und aggregierten Fragmenten getrennt werden.

3.3.3 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der Antikörperpräparationen erfolgte mittels automatisierter Kapillargelelektrophorese (Experion Pro260, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Die Antikörperpräparationen wurden nach Herstellerangaben vorbereitet, unter nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetragen und die Elektrophorese nach Herstellerangaben gestartet.

3.3.4 Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung der mAk wurde die SDS-PAGE verwendet. Die Antikörper wurden entweder unter denaturierenden oder nicht-denaturierenden Bedingungen aufgetrennt. Die Proteinproben wurden mit 5 x Ladepuffer (Laemmli-Puffer) gemischt, 10 min bei 95 °C erhitzt und anschließend auf das Gel (NuPAGE 4-12 % Bis-Tris-Gel; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) aufgetragen. Als Marker fungierte der Precision Plus Protein™ Dual Color Standard (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). Als Laufpuffer diente 1 x MOPS-SDS-Running-Buffer (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Die Gele liefen bei 100 mV für 90 min (PowerPack HCT™; Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) in der XCell SureLock™ Elektrophoresekammer (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Im Anschluss erfolgte die Detektion der Proteinbanden mit einer Coomassie-Färbung durch das SimplyBlue SafeStain Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Die Färbung erfolgte nach Herstellerangaben.

3.3.5 Western Blot

Zur Immundetektion wurden die mAk zunächst wie in 2.2.2. beschrieben mittels einer SDS-PAGE aufgetrennt. Daraufhin erfolgte der Transfer auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Amersham Hybond™-P, GE Healthcare, St Giles, UK), welche zuvor mittels Methanol aktiviert wurde. Der Elektrotransfer der Proteine lief bei 50 mA pro Gel für 90 min in der TRANS-BLOT® SD Semi-Dry Transferzelle (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). Nach dem Transfer wurde die Membran mittels Western Blot-Blocking-Puffer (in 1x TBS +5% w/v MMP + 0,1% v/v Tween20) über Nacht bei 4 °C geblockt. Am nächsten Tag erfolgte die Detektion mittels HRP-konjugierten polyklonalen Ziege-anti-humane Kappa-Leicht-Ketten-Antikörpern (BIOZOL GmbH, Eching, D) oder HRP-konjugierten polyklonalen Ziege-anti-humane

Material und Methoden

IgG-Antikörpern (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Hierfür wurden die jeweiligen Detektionsantikörper 1:4000 in Western Blot-Blocking-Puffer verdünnt und die blockierten Membranen mit den Detektionsantikörperlösungen für eine Stunde bei 4 °C inkubiert. Im Folgenden wurden die Membranen dreimal mit Western Blot-Wasch Puffer (1x TBS supplementiert mit 0,1 % v/v Tween) für 30 min gewaschen. Die Antikörper wurden schließlich mittels Chemilumineszenz (SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate Kit, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) im Gel Doc™ XR+ System (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) visualisiert

3.4 Zellbiologische Methoden

3.4.1 Zellkultur

Die humane epidermale Vulvakarzinom Zelllinie A431 und die Baby Hamster Nieren Zelllinie 21 (engl. *baby hamster kidney 21*, BHK-21) (beide DSMZ Braunschweig, Deutschland), welche mit dem humanen EGFR stabil transfiziert worden waren (Derer et al., 2012b), wurden in RPMI 1640 gehalten. Die humane kolorektale Karzinomzelllinie DiFi (M. D. Anderson Cancer Center, University of Texas, TX, USA) und die Glioblastom Zelllinie A1207 (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, U.K.) wurden in DMEM supplementiert mit Glutamat gehalten. Die chinesische Hamster-Ovarien Zelllinie K1 (CHO-K1, Lonza Group Ltd., CH) wurde nach Herstellerangaben in DMEM supplementiert mit Glutamat und nach Transfektion in DMEM-select gehalten. Die Zellkulturmedien, wurden mit 10% hitzeinaktivierten FCS (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) supplementiert, mit Ausnahme von DMEM-select, welches mit dialysierten hitzeinaktivierten FCS (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) supplementiert wurde. Zusätzlich wurden alle Zellkulturmedien mit 100 U/ml Penicillin und 100 mg/ml Streptomycin (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Der Selektionsdruck für die BHK-EGFR⁺-Transfektanten wurde bei 1 mg/ml Geneticin (PAA, Pasching, A) gehalten.

Die Zellkulturarbeiten wurden mit sterilen Einmalplastikprodukten (Sarstedt, Nürnberg, D) in sterilen Reinluftbänken (Hera Safe; Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) ausgeführt. Alle verwendeten Zelllinien waren adhärent wachsende Zellen, welche in Zellkulturflaschen (Sarstedt, Nürnberg, D) im Brutschrank (Hera cell 240 Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) bei 37° C und 5 % CO₂-Gehalt kultiviert wurden. Zellen, welche für Experimente benötigt wurden, wurden präpariert, indem sie mittels 0,05 % EDTA-Trypsin (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) vom Boden der

Material und Methoden

Kulturflasche abgelöst wurden. Für die BHK-Zelllinien wurde Accutase (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) verwendet. Nachdem sich die Zellen vom Boden gelöst hatten, wurden sie mit Medium aufgenommen und für fünf Minuten mit 1.500 rpm bei Raumtemperatur abzentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0R Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Nach der Zentrifugation wurden die Zellen in Medium resuspendiert. Die Bestimmung der Zellzahl wurde mittels einer Neubauer-Zellkammer durchgeführt. Des Weiteren wurde während der Bestimmung der Zellzahl die Zellviabilität mit Hilfe von Trypanblau (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) ermittelt. Alle Zelllinien wurden zweimal pro Woche gesplittet und maximal 15 Passagen in Kultur gehalten. Das Splitten der Zellen wurde immer zu festen Zeitpunkten durchgeführt. Zudem wurden die Zellen nach dem Splitten mit einer Zellzahl ausgesät, so dass die Konfluenz am folgenden Tag bei circa 60 % lag. Alle verwendeten Zelllinien wurden in regelmäßigen Abständen auf eine Kontamination mit Mykoplasmen kontrolliert.

3.4.2 Präparation von humanem Serum und Plasma

Zur Präparation von humanem Serum wurde gesunden Spendern unter Verwendung einer S-Monovette 9 ml Z (Sarstedt, Nürnberg, D) 9 ml peripheres Blut abgenommen. Die Monovetten wurden im Anschluss für 20 min auf Eis inkubiert. Daraufhin folgte eine Zentrifugation für 20 min bei 2000 rpm und 4 °C (Heraeus Megafuge 1.0R Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Während der Zentrifugation trennte sich das Serum von den festen Bestandteilen des Blutes, welche durch einen Koagulationsaktivator in der Serum-Monovette ausgefallen waren. Das humane Serum konnte entweder direkt für funktionelle Experimente verwendet oder bei -80 °C eingefroren werden.

Im Gegensatz zur Präparation von humanem Serum zeichnet sich humanes Plasma durch das Vorhandensein eines vollständig intakten Koagulationssystems aus. Daher unterschied sich die Präparation von Serum und Plasma. Zur Präparation von humanem Plasma wurden gesunden Spendern unter Verwendung einer S-Monovette 8,2 ml 9NC (Sarstedt, Nürnberg, D) 9 ml peripheres Blut abgenommen. Die S-Monovette 8,2 ml 9NC beinhaltet 0,106 mol/l Tri-Natrium-Citrat als Gerinnungsinhibitor. Nach der Abnahme wurde das Blut auf einen Gradienten aus 3ml 63 % und 3ml 70 % Percoll (Easycoll Separating Solution, Biochrom AG, Berlin, D) geschichtet. Der Gradient aus Blut und Percoll wurde 20 min bei 2500 rpm (Heraeus Megafuge 1.0R Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) unter Verwendung einer möglichst geringen Bremsleistung zentrifugiert. Nach der Zentrifugation bestand der fertige Gradient aus

fünf Schichten, wobei die oberste Schicht das fertig präparierte humane Plasma darstellte. Das humane Plasma konnte entweder direkt für funktionelle Experimente verwendet oder bei -80 °C eingefroren werden.

3.4.3 Durchflusszytometrische Analysen

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden eine Reihe durchflusszytometrischer Analysen durchgeführt. Hierbei können direkte und indirekte Immunfluoreszenzuntersuchungen unterschieden werden. Bei direkten Immunfluoreszenzuntersuchungen wird ein fluorochromkonjugierter Primärantikörper verwendet, während bei den indirekten Analysen ein Primärantikörper eingesetzt und dieser durch einen fluorochrommarkierten Sekundärantikörper nachgewiesen wird. Zwischen den einzelnen Schritten und abschließend wurden die Zellen jeweils dreimal mit 100 µl FACS-Puffer, bestehend aus 1 x PBS mit 1 % w/v BSA (Carl ROTH, Karlsruhe, D) und 1% v/v Natrium-Azid (Merck, Darmstadt, D), gewaschen. Zum Schluss wurden die Zellen in 500 µl FACS-Puffer aufgenommen und im Durchflusszytometer analysiert. Für die Waschschrte wurden die Zellen 3 min bei 1.700 rpm zentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0R Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) der Überstand verworfen und die Zellen in der entsprechenden Puffern resuspendiert.

Für die indirekte durchflusszytometrischen **Analyse der Antigenbindung** (Tabelle 12) wurden 10^5 Zielzellen mit unterschiedlichen Konzentrationen (0 nM - 333,35 nM) der primären Antikörper in FACS-Puffer für 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und mit FITC-konjugierten Hase anti-humanes IgG F(ab)₂ Fragmenten (Dako, Glostrup, Denmark), welche 1:500 in FACS-Puffer verdünnt worden waren, für 30 min auf Eis inkubiert.

Tabelle 12. Bedingungen für den Nachweis einer EGFR-Bindung

Zielzelle	Zellzahl	Spezifischer mAk	Primärer Ak	Inkubationszeit
A431	1×10^5	Anti-EGFR-IgG1 Anti-EGFR-IgG3 Ktrl-IgG1 Ktrl-IgG3	FITC-Hase anti-humanes -IgG	1. 30 min spezifische mAk 2. 30 min primäre mAk
DiFi	1×10^5	Anti-EGFR-IgG1 Anti-EGFR-IgG3 Ktrl-IgG1 Ktrl-IgG3	FITC-Hase anti-humanes -IgG	1. 30 min spezifische mAk 2. 30 min primäre mAk
BHK-EGFR ⁺	1×10^5	Anti-EGFR-IgG1 Anti-EGFR-IgG3 Ktrl-IgG1 Ktrl-IgG3	FITC-Hase anti-humanes -IgG	1. 30 min spezifische mAk 2. 30 min primäre mAk

Material und Methoden

Zum Schluss wurden die Zellen wiederum mit FACS-Puffer gewaschen und daraufhin im Fluoreszenzkanal 1 des Durchflusszytometers (Epics Profile, Beckman Coulter, Brea, CA) gemessen. Die relative Immunfluoreszenz-Intensitäten (RFI) wurden im Anschluss anhand der mittleren Fluoreszenzintensitäten mit folgender Formel berechnet:

$$RFI = \left(\frac{MFI(\text{spezifischer mAk})}{MFI(\text{ktrl-mAk})} \right)$$

Die durchflusszytometrische **Quantifizierung der Antigendichte** (Tabelle 13) auf der Zielzelloberfläche erfolgte mit Hilfe des QIFIKITs (DAKO, Glostrup, DK). Grundsätzlich wurden 10^5 Zielzellen mit murinen monoklonalen Antikörpern als Primärantikörper, welche das Zielantigen erkannt und gebunden haben, für 60 min bei 4 °C inkubiert. Darauf wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen. Im Anschluss wurde als Sekundärantikörper ein FITC-konjugierter-Ziege-anti-Maus-Antikörper, welcher 1:50 in FACS-Puffer verdünnt worden war, zu den Zielzellen gegeben. Es folgte wiederum eine Inkubation für 45 min bei 4 °C. Im Anschluss wurden die Zellen wiederum mit FACS-Puffer gewaschen und konnten im Fluoreszenzkanal 1 des Durchflusszytometers (Epics Profile, Beckman Coulter, Brea, CA) gemessen werden. Zur Quantifizierung der Antigene bedurfte es der Generierung einer Eichgeraden, welche nach Herstellerangaben bestimmt wurde. Zudem wurde das Zytometer nach Herstellerangaben eingestellt.

Tabelle 13. Durchflusszytometrische Bestimmung der Antigenexpressionsdichte

Oberflächen Antigen	Zielzellen	Primärer Antikörper (monoklonaler)	Sekundärer Antikörper (polyklonaler)
EGFR	A431	M425	
CD46	A1207	0846	
CD55	DiFi	S031	FITC-Ziege-Anti-Maus
CD59	BHK-EGFR ⁺ #5	Mem43	

Für die durchflusszytometrischen **Analysen der Komplementfragmentanlagerung** (Tabelle 14) wurden 10^5 Zielzellen mit den spezifischen Antikörpern in 1 x PBS mit 0.11 mM Mg²⁺ (Carl ROTH, Karlsruhe, D), im Fall der BHK-EGFR⁺ #5 Zellen in Zellkulturmedium, für 15 min auf Eis inkubiert. Für die einzelnen Antikörper lag die

Material und Methoden

Konzentration bei 66,67 nM, bei der Positivkontrolle, bestehend aus zwei nicht-epitopüberlappenden anti-EGFR-IgG1 (225-IgG1 und 003-IgG1), wurde jeder Antikörper mit einer Konzentration von 33,34 nM eingesetzt. Im Anschluss wurde 25% v/v humanes Serum zu den Ansätzen gegeben, gefolgt von einer Inkubation für 10 min bei 37 °C. Daraufhin wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und entweder mit FITC-konjugierten polyklonalen Ziege anti-humanes C1q oder C4(b/c) Antikörpern (DAKO, Glostrup, DK) oder mit monoklonalen Maus-anti-humanes (i)C3(b) (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) // Faktor Bb (Quidel, San Diego, CA, USA) // C5b-9-Antikörpern (Quidel, San Diego, CA, USA) inkubiert. Die FITC-konjugierten polyklonalen Antikörper wurden 1:10, die monoklonalen 1:500 in FACS-Puffer verdünnt. Es folgte eine Inkubation für eine Stunde bei 4 °C im Dunkeln. Daraufhin wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen. Die polyklonalen Ansätze konnten nun direkt im Fluoreszenzkanal 1 des Durchflusszytometers (Epics Profile; Beckman Coulter, Brea, CA) gemessen werden. Die monoklonalen Ansätze wurde im Gegensatz noch einer sekundären Färbung mit FITC-konjugierten polyklonalen Ziege anti-Maus Fc-gamma-spezifischen F(ab)₂-Fragmenten (Jackson ImmunoResearch Laboratories, WestGrove, PA, USA) unterzogen, wobei der sekundäre Antikörper 1:50 in FACS-Puffer verdünnt wurde. Für diese sekundäre Färbung folgte wiederum eine Inkubation von 30 min bei 4 °C im Dunkeln. Nach dieser Inkubationsperiode wurden die Zellen wiederum mit FACS-Puffer gewaschen und anschließend im Fluoreszenzkanal 1 des Durchflusszytometers (Epics Profile; Beckman Coulter, Brea, CA) analysiert.

Tabelle 14. Versuchsbedingungen für die Analysen einer Komplementanlagerung

Komplement-Komponente	Zielzelle	Spezifischer Antikörper	Primär-antikörper	Sekundär-antikörper	Inkubationszeit
C1q			FITC-Ziege-anti-humanes-C1q		1. 15 min spezifische mAk 2. 10min Serum
C4(b/c)	A431 DiFi BHK-	anti-EGFR-IgG1 anti-EGFR-IgG3 Ktrl-IgG1	FITC-Ziege-anti-humanes-C4(b/c)		3. 60min primäre pAk
(i)C3(b)	EGFR ⁺ #5	Ktrl-IgG3 Positivekontrolle	Maus-anti-humanes-(i)C3(b)	FITC-Hase-anti-Maus-	1. 15 min spezifische mAk 2. 10 min Serum
Faktor Bb			Maus-anti-humaner-Faktor Bb	IgG-Fc-Fragment-spezifisch	3. 60 min primäre mAk 4. 30 min
C5b-9			Maus-anti-humanen-C5b-9		sekundärer pAk

Das Ausmaß der jeweiligen Anlagerung einer Komplementkomponente wurde in Relation zur Positivkontrolle gesetzt und anhand folgender Formel berechnet:

$$\text{Relative Deposition} = \left(\frac{\frac{RFI(\text{spezifischer mAk})}{RFI(\text{ktrl-mAk})}}{\frac{RFI(\text{Positivkontrolle})}{RFI(\text{ktrl-mAk})}} \right) \times 100$$

Zur Bestimmung der **Anaphylatoxin-Freisetzung** wurde das Anaphylatoxin Kit der Firma BD Biosciences (San Diego, CA, USA) verwendet. Grundsätzlich wurde im ersten Schritt des Experimentes 25% (v/v) humanes Plasma, supplementiert mit 25 µg/ml Lepirudin (Refludan, Pharmion, Hamburg, D) und RPMI 1640, supplementiert mit 10 % hitzeinaktivierten FCS und Pen/Strep, in einer 96-Well-Mikrotiter-Platte vorgelegt. Daraufhin wurden EGFR-gerichteten Antikörper (IgG1 oder IgG3, jeweils mit 66,67 nM) oder die positive Kontrolle (225-IgG1 und 003-IgG1, beide bei 33,34 nM) in die Wells gegeben. Das Experiment wurde durch die Zugabe von 5×10^4 Zielzellen gestartet, wobei das Gesamtvolumen im Ansatz nun bei 200 µl lag. Nach einer Inkubation für drei Stunden bei 37 °C wurde der Überstand 1:200 verdünnt und im Anschluss die Freisetzung der Anaphylatoxine nach Herstellerangaben mittels kalibrierter Durchflusszytometrie unter Verwendung des Navios Durchflusszytometers (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) bestimmt.

3.4.4 siRNA-vermittelte Herunterregulierung von CD46, CD55 und CD59

Zur spezifischen Herunterregulierung der *mCRPs* CD46, CD55 und CD59 wurde die RNAi-Technologie (engl. *RNA interference*; RNAi) verwendet. Als Zielzellen einer siRNA (engl. *small interfering RNA*, siRNA)-vermittelten Herunterregulierung wurden A431 Zellen verwendet. A431 Zellen wurden mit einer Dichte von 10^6 in einer 10cm-Platte ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit *mCRP*-spezifischer siRNA (gegen CD46, CD55 oder CD59) oder mit Kontroll-siRNA transfiziert. Als Transfektionsmethode wurde die Lipofektion unter Verwendung von Lipofectamine 2000 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) nach Herstellerangaben verwendet. Die verwendeten synthetischen siRNAs wurden von Life Technologies (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) erworben (Sequenzen der siRNAs: im Anhang in Tabelle 27).

Als Kontroll-siRNA diente die Low GC Duplex siRNA (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Die Effizienz der siRNA-vermittelten Herunterregulierung der *mCRPs* wurde in einer direkten Immunfluoreszenz im Durchflusszytometer (Navios Beckman Coulter, Brea, CA, USA) unter Verwendung eines monoklonalen Pacific blue-

Material und Methoden

konjugierten Maus-anti-humanes CD46 Antikörpers (Exbio, Praha, CZ), eines monoklonalen PE-konjugierten Maus-anti-humanes CD55 Antikörpers (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) oder eines monoklonalen FITC- konjugierten Maus-anti-humanes CD59 Antikörpers (Exbio, Praha, CZ). Irrelevante Pacific blue/PE/FITC-konjugierte Maus-anti humane Antikörper (Exbio, Praha, CZ) fungierten als Kontrollen

3.4.5 Überexpression von CD55 und CD59

BHK-EGFR⁺ #5 Zellen wurden mit einer Dichte von 10⁶ in einer 10cm-Platte ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 12 µg eines pCMV6-Entry Vektor (catalog no. PS100001; OriGene Technologies, Rockville, MD, USA) oder 12 µg eines pCMV6-Entry-CD55 Vektor (catalog no. RC201615; OriGene Technologies, Rockville, MD, USA) transfiziert. Als Transfektionsmethode wurde wiederum die Lipofektion unter Verwendung von Lipofectamine 2000 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) nach Herstellerangaben verwendet. Der Erfolg der Transfektion wurde im Durchflusszytometer unter Verwendung eines monoklonalen PE-konjugierten Maus-anti-Humans CD55 Antikörpers (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) und eines FITC-konjugierten Kontrollantikörpers (Exbio, Praha, CZ) überprüft.

3.4.6 Zellviabilitätstest

Zur Untersuchung der Wachstumsinhibition von DiFi Zellen wurde der MTS ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium)) - Test nach Herstelleranweisungen verwendet (Promega, Madison, WI, USA). Die Zellen wurden in eine 96-Well-Mikrotiterplatte mit Dichte von 5 x 10³ Zellen/Well ausgesät und mit unterschiedlichen Konzentrationen (0 - 333,35 nM) der mAk behandelt. Nach einer Inkubation für 72 Stunden bei 37 °C wurde das MTS-Substrat hinzugegeben und die Absorption bei 490 nm und einer Referenzwellenlänge von 670 nm gemessen. Die prozentuale Wachstumsinhibition wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Wachstumsinhibition [\%]} = \left(\frac{\text{Absorption (spezifischer mAk)}}{\text{Absorption(ohne mAk)}} \right) \times 100$$

3.4.7 Komplement-abhängige Zytotoxizität

Komplement-abhängige Zytotoxizität oder CDC wurde unter Verwendung des ⁵¹Chrom (⁵¹Cr)-Freisetzungstest bestimmt. Zuerst wurden die Zielzellen für zwei Stunden mit

Material und Methoden

200 μCi [^{51}Cr] (Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig, D) inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zielzellen dreimal gewaschen. Im Falle von A431, A1207 oder DiFi geschah dies mit 1x PBS supplementiert mit 0,11 mM Mg^{2+} (Carl ROTH, Karlsruhe, D). Unter Verwendung von BHK-21-EGFR⁺ Zellen als Zielzellen wurde diese mit Zellkulturmedium gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet resuspendiert und die Zellzahl auf eine Zelldichte von 6×10^4 Zellen pro 50 μl eingestellt.

Das 25% v/v Serum als Quelle für das Komplementsystem wurde entweder mit 1 x PBS supplementiert mit 0,11 mM Mg^{2+} (Carl ROTH, Karlsruhe, D) oder im Falle von BHK-21-EGFR⁺ Zellen mit Zellkulturmedium in 96-Well-Mikrotiter-Platten vorgelegt. Daraufhin wurden unterschiedliche in die Wells gegeben. Die Serumtitration in CDC-Experimenten erfolgte mit einer konstanten mAk-Konzentration von 66,67 nM und folgenden Serum-konzentrationen: 0-25 %.

Im Folgenden wurde pro Well 50 μl der chromierten Zielzellsuspension in die vorbereitete Mikrotiter-Platte gegeben, so dass ein Gesamtvolumen von 200 μl pro Well erreicht wurde. Nach einer Inkubation von drei Stunden bei 37 °C wurden die 96-Well-Platten mit 2.000 rpm über 5 min zentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0R, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Zur Bestimmung der Kinetik der Komplementaktivierung wurde der CDC-Test mit 25 % v/v humanen Serum und 66,67 nM mAk gestartet und zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0 min; 7,5 min; 15 min; 30 min; 60 min; 120 min; 240 min) abgebrochen, in dem die zu untersuchende 96-Well-Mikrotiter-Platte auf Eis gestellt wurde. 25 μl der jeweiligen CDC-Test-Überstände wurden mit 150 μl eines Szintillationsmixes (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) auf optisch aktiven 96-Well-Platten vermengt, die Platten versiegelt (TopSeal-A, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) und anschließend für 15 min auf einem Orbitalschüttler (Titramax 101, Heidolph, Schwabach, D) geschüttelt. Danach wurde das Ausmaß des durch Zelllyse freigesetzten ^{51}Cr indirekt durch das Ausmaß der durch Radioaktivität induzierten Szintillation (Szi) in einem Szintillationsmessgerät (MicroTriLux, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) als *cpm* (engl. *counts per minute*, *cpm*) gemessen. Die prozentuale Zelllyse wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Lyse [\%]} = \left(\frac{\text{experimentelle Szi [cpm]} - \text{basale Szi [cpm]}}{\text{maximale Szi [cpm]} - \text{basale Szi [cpm]}} \right) \times 100$$

Material und Methoden

Maximale Szintillation, das heißt maximale $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzung, wurde durch vollständige Lyse der Zielzellen durch 1 x PBS + 2% Triton X (Merck, Darmstadt, D) erreicht. Die basale Lyse wurde in Abwesenheit von Antikörpern gemessen. Eine unspezifische Lyse der Zielzellen durch das Serum allein konnte nicht beobachtet werden.

In *CDC*-Experimenten, bei welchen depletierte Seren (C1q-depletiertes Serum und Faktor B-depletiertes Serum) als Quelle des Komplementsystems verwendet wurden, erfolgte die Rekonstitution entweder mit 100 $\mu\text{g/ml}$ C1q oder 200 $\mu\text{g/ml}$ Faktor B (Seren und Proteine von ComplementTechnology, Tyler, TX, USA). Des Weiteren wurde in Experimenten mit Faktor B-depletierten Seren 1 x PBS mit 0,5 mM Mg^{2+} (Carl ROTH, Karlsruhe, D) und 0,15 mM Ca^{2+} (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) supplementiert.

Um die alternative Komplementaktivierung in *CDC*-Experimenten zu inhibieren, wurde ein Fusionsprotein, bestehend aus den extrazellulären Domänen des Complement Rezeptor der Ig-Superfamilie (engl. *complement receptor of the Ig-superfamily*, CRiG) und einem humanen IgG1-Fc-Teil, *CRiG*-Fc (Genentech, San Diego, CA, USA) verwendet. Der *CRiG* vermittelt zum einen die Phagozytose von C3-opsonisierten Zellen oder Pathogenen durch Makrophagen (Helmy et al., 2006), zum anderen fungiert *CRiG* als Inhibitor der alternativen Komplementkonvertasen, indem *CRiG* die Bindung von C3 und C5 an diese Konvertasen verhindert (Wiesmann et al., 2006).

4 Ergebnisse

4.1 Produktion und biochemische Charakterisierung von rekombinanten Antikörpern

4.1.1 Generierung der Expressionsvektoren

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollten Antikörper vom humanen IgG1- und IgG3-Isotyp generiert werden, welche entweder gegen EGFR oder ein Kontrollantigen, in diesem Fall CD20, gerichtet sind. Hierfür sollten Expressionsvektoren erstellt werden, welche für die jeweiligen schweren Ketten (Tabelle 15) kodieren. Die jeweiligen Expressionsvektoren für die leichten Ketten lagen zu Beginn der Arbeit bereits vor.

Tabelle 15. Überblick über die verwendeten Expressionsvektoren

Expressionsvektor	Variable Domäne	konstante-Domäne	Antikörper Konstrukt
pEE14.4-225VH-IgG1	225 VH*	IgG1-Fc	anti-EGFR-IgG1
pEE14.4-225VL-Kappa	225 VL ^o	Kappa	anti-EGFR-IgG1 anti-EGFR-IgG3
pEE14.4-225VH-IgG3	225 VH*	IgG3-Fc	anti-EGFR-IgG3
pEE14.4-c2B8VH-IgG1	C2B8 VH*	IgG1-Fc	ktrl-gG1
pEE14.4-c2B8VL-Kappa	C2B8 VL ^o	Kappa	ktrl-IgG1 ktrl-IgG3
pEE14.4-c2B8VH-IgG3	C2B8 VH*	IgG3-Fc	ktrl-IgG1

* VH= variable schwere Kette/ ^o VL = variable leichte Kette

Die Klonierungsstrategie zur Erstellung der pEE14.4-225VH-IgG1 und pEE14.4-225VH-IgG3 Expressionsvektoren sah wie folgt aus (Abbildung 13). Vor Antritt der Arbeit existierte ein pEE14.4-225VH-IgA2Vektor, welcher die schwere Kette eines EGFR-gerichteten IgA Antikörpers kodierte. Mittels einer *NotI* und *EcoRI* Restriktion wurde die IgA2-Fc-Domänen aus dem Vektor entfernt, so dass ein pEE14.4-225VH-Vektor entstand, welcher nur noch die variablen Domänen beinhaltet. Die IgG1- und IgG3-Fc-Sequenzen wurden *de novo* synthetisiert, in einen pEN08H-Vektor subkloniert und enthielten am 5'-Ende eine *NotI* und am 3'-Ende eine *EcoRI* Restriktionsschnittstelle. Mittels *NotI* und *EcoRI* Restriktion entstanden entweder IgG1-Fc- oder IgG3-Fc-Fragmente. Nach Ligation vom pEE14.4-225VH-Vektor mit entweder einem IgG1-Fc- oder einem IgG3-Fc-Fragment entstanden die Expressionsvektoren für die schweren Ketten (pEE14.4-225VH-IgG1 und pEE14.4-225VH-IgG3).

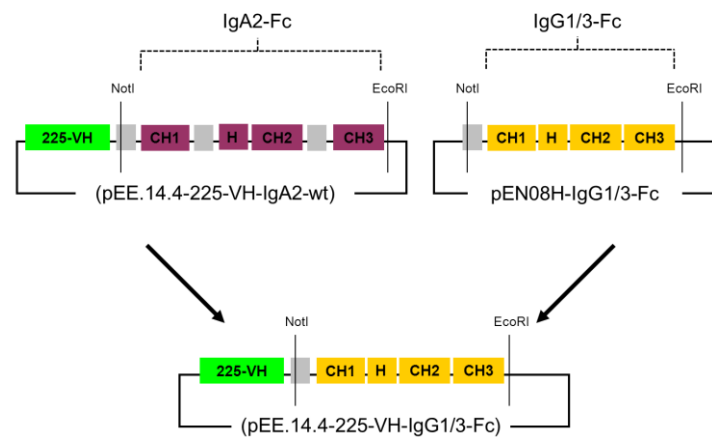


Abbildung 13. Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie für pEE14.4-225VH-IgG1 und pEE14.4-225VH-IgG3. VH= variable Domäne, CH1-3= konstante Domäne 1-3, H = *hinge* Region

Im nächsten Schritt erfolgte die Transformation von *E. coli* Mach1 mit den pEE14.4-225VH-IgG1 und pEE14.4-225VH-IgG3 Plasmiden. Dies diente zur Amplifikation der Vektoren. Nach Plasmid-Isolation mittels Mini-Prep wurden die pEE14.4-225VH-IgG1 und pEE14.4-225VH-IgG3 Vektoren, wie auch der vorrätige pEE14.4-225VL-Kappa-Vektor sequenziert. Zusätzlich zur Sequenzierung erfolgte ein *NotI* *EcoRI* Testverdau mit den isolierten pEE14.4-225VH-IgG1 und pEE14.4-225VH-IgG3 Vektoren (Abbildung 14), so dass die IgG1-Fc- oder IgG3-Fc-Fragmente nach korrekter Klonierung wieder herausgeschnitten werden konnten.

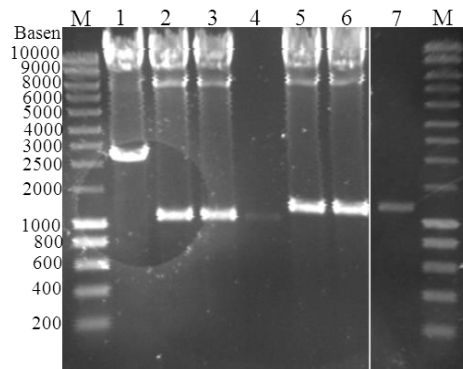


Abbildung 14. Testverdau der pEE14.4-225VH-IgG1 und pEE14.4-225VH-IgG3 Vektoren. Die Plasmide (pEE14.4-225VH-IgG1, pEE14.4-225VH-IgG3, pEE14.4-225VH-IgA2) wurden mit den Restriktionsenzymen *NotI* und *EcoRI* für 15 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Danach erfolgte die gelelektrophoretische Auftrennung der Verdau im Agarose-Gel (1 %) für 45 min. Zusätzlich zu den Restriktionen wurden auch noch die IgG1-Fc- und IgG3-Fc-Fragmente aus den pEN08H-Vektoren als interne Kontrolle aufgetragen. M = Smart Ladder; Spur 1 = pEE14.4-225VH-IgA2; Spur 2 und Spur 3 = pEE14.4-225VH-IgG1; Spur 4 = IgG1-Fc-Fragment; Spur 5 und Spur 6 = pEE14.4-225VH-IgG3; Spur 7 = IgG3-Fc-Fragment.

Die Klonierungsstrategie zur Erstellung der pEE14.4-c2B8VH-IgG1 und pEE14.4.-c2B8VH-IgG3 Vektoren für die Expression der Kontrollantikörper ist in Abbildung 15 dargestellt.

Ergebnisse

Wiederum diente der pEE14.4-225VH-IgA2 Vektor als Ausgangspunkt zur Generierung der Expressionsplasmide für die Kontrollantikörper. Mittels einer *HindIII* und *NotI* Restriktion wurde diesmal aber im Gegensatz zur eben beschriebenen Klonierungsstrategie zuerst der 225VH-Part aus dem Vektor entfernt, so dass ein pEE14.4-IgA2-Vektor entstand, welcher nur noch die konstanten Domänen der schweren Kette eines IgA2 Antikörpers beinhaltete. Die c2B8VH-Sequenz wurden *de novo* synthetisiert, in einen pEN08H-Vektor subkloniert und enthielt am 5'-Ende eine *HindIII* und am 3'-Ende eine *NotI* Restriktionsschnittstelle. Mittels *HindIII* und *NotI* Restriktion entstand ein c2B8VH-Fragment. Nach Ligation von pEE14.4-IgA2-Vektor mit dem c2B8VH-Fragment, entstand der die variable Domäne des Kontrollantikörpers kodierende Vektor pEE14.4-c2B8VH-IgA2. Im Folgenden wurden mittels einer *NotI* und *EcoRI* Restriktion wieder die IgA2-Fc-Domänen aus dem Vektor entfernt, so dass ein pEE14.4-c2B8VH-Vektor entstand. Nach Ligation von pEE14.4-c2B8VH-Vektor wiederum mit entweder einem IgG1-Fc- oder einem IgG3-Fc-Fragment, entstanden die jeweiligen Expressionsvektoren für die schweren Ketten der Kontrollantikörper pEE14.4-c2B8VH-IgG1 und pEE14.4-c2B8VH-IgG3.

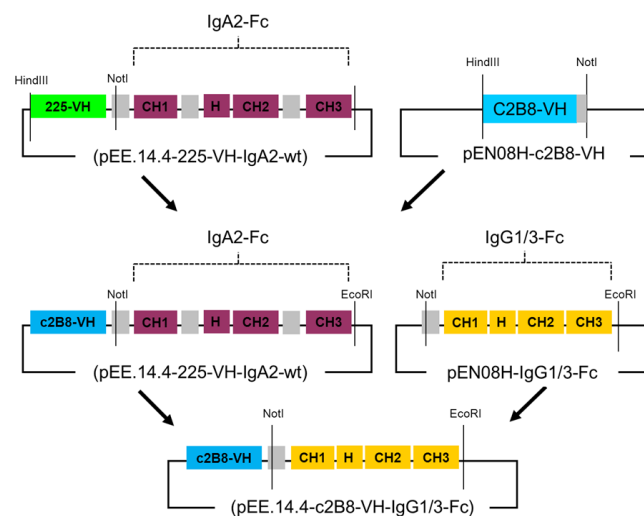


Abbildung 15. Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie für pEE14.4-225VH-IgG1 und pEE14.4-225VH-IgG3. VH= variable Domäne, CH1-3= konstante Domäne 1-3, H = *hinge* Region

Im nächsten Schritt wurden die pEE14.4-c2B8VH-IgG1 und pEE14.4-c2B8VH-IgG3 Vektoren wiederum in *E. coli* Mach1 transformiert und nach Plasmid-Isolation inklusive des vorrätigen pEE14.4-c2B8VL-Kappa-Vektors sequenziert. Zusätzlich zur Sequenzierung erfolgte sowohl ein *HindIII NotI* sowie ein *NotI EcoRI* Testverdau mit den isolierten pEE14.4-225VH-IgG1 und pEE14.4-225VH-IgG3 Vektoren (Abbildung 16), so dass die IgG1-Fc- oder IgG3-Fc-Fragmente, wie auch das c2B8VH-Fragment nach korrekter Klonierung wieder herausgeschnitten werden konnten.

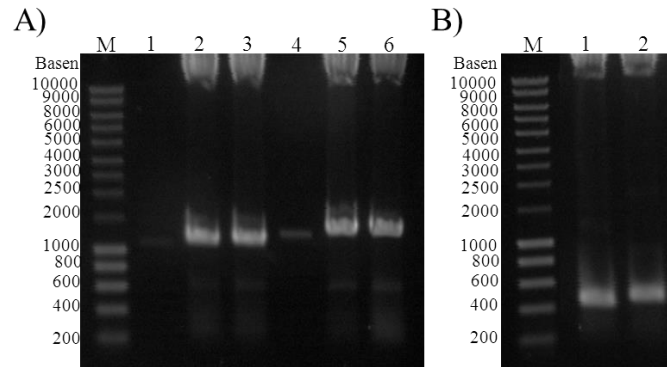


Abbildung 16. Testverdau der pEE14.4-c2B8VH-IgG1 und pEE14.4-c2B8VH-IgG3 Vektoren. Die Plasmide (pEE14.4-c2B8VH-IgG1, pEE14.4-c2B8VH-IgG3) wurden mit den Restriktionsenzymen *NotI* und *EcoRI* (A) oder *HindIII* und *NotI* (B) für 15 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Danach erfolgte die gelelektrophoretische Auftrennung der Verdauung im Agarose-Gel (1,5%) für 45 min. Zusätzlich zu den Restriktionen wurden auch noch die IgG1-Fc- und IgG3-Fc-Fragmente aus den pEN08H-Vektoren als interne Kontrolle aufgetragen. (A) M = Smart Ladder; Spur 1 = IgG1-Fc-Fragment; Spur 2 und Spur 3 = pEE14.4-c2B8VH-IgG1; Spur 4 = IgG3-Fc-Fragment; Spur 5 und Spur 6 = pEE14.4-c2B8VH-IgG3;. (B) M = Smart Ladder; Spur 1 = pEE14.4-c2B8VH-IgG1-wt; Spur 2 = pEE14.4-c2B8VH-IgG3

4.1.2 Expression von EGFR-gerichteten mAk und Kontroll-mAk in CHO-K1-Zellen

Für die Expression der EGFR-gerichteten Antikörper wie auch der Kontrollantikörper wurden die im Abschnitt 3.1.1. generierten Expressionsvektoren für die schweren Ketten, sowie die vor Antritt der Promotion vorliegenden Expressionsvektoren für die leichten Ketten verwendet. CHO-K1-Zellen wurden mit gleichen Mengen an Vektoren für die leichten und schweren Ketten mittels Lipofektion transfiziert. Daraufhin erfolgte eine Selektion mittels MSX (50 mM). Die entstandenen Einzelzellkolonien wurden im Anschluss an die Selektion in 96-Well-Platten ausgesät. Nach einer Phase des Anwachsens wurden die Einzelzellkolonien auf die Expression der Antikörper (anti-EGFR-IgG1 bzw. -IgG3 / ktrl-IgG1 bzw. -IgG3) untersucht. Hierfür wurde von jedem Einzelklon die Hälfte der Zellmasse in 6-Well-Platten zur weiteren Anzucht überführt. Die übrige Einzelklonzellmasse verblieb in der ursprünglichen 96-Well-Platte. Nach einer Inkubation von zwei Tagen wurde der Zellkulturüberstand aus den 96-Well-Platten mittels eines humanen-IgG-spezifischen ELISAs auf die Expression der Antikörper untersucht (Abbildung 17). Zur genaueren Bestimmung der Klon-spezifischen Antikörperproduktionsraten wurde die Zellviabilität eines jeden Einzelklons mittels MTS-Test im 96-Well-Format untersucht. Zum Schluss wurde für jeden Einzelzellklon die Expression der Antikörper in Relation zur viablen Zellmasse gesetzt und so eine Expressions/Viabilitäts-Ratio gebildet. Die Einzelzellklone mit der höchsten Expressions/Viabilitäts-Ratio wurden für die endgültigen Antikörperproduktionen verwendet.

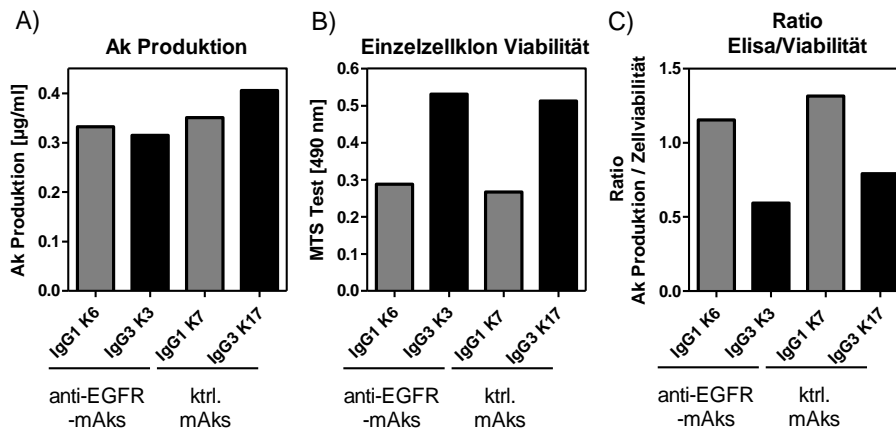


Abbildung 17. Analyse der antikörperproduzierenden Einzelzellklone. Dargestellt sind die Einzelklone, welche für die Produktion der Antikörper ausgewählt wurden. (A) Die Antikörperproduktion wurde mittels ELISA in nicht aufgereinigten Zellkulturüberständen analysiert. In (B) sind die mittels MTS-Test bestimmten Zellviabilitäten der Einzelzellklone dargestellt. (C) Im Anschluss wurde die Ratio aus Antikörperproduktion und Zellviabilität bestimmt.

Hierfür wurden über einen Zeitraum von vier bis acht Wochen die Zellkulturüberstände der ausgewählten Einzelklone gesammelt, im Folgenden aufgereinigt und auf Expressionsmengen und Reinheit der Antikörper untersucht.

4.1.3 Reinigung der rekombinanten Antikörper

Im ersten Schritt der Antikörperpräparation wurden aus den Zellkulturüberständen mittels einer anti-humane-Kappa-Leichtketten Affinitätschromatographie spezifisch die monoklonalen rekombinanten Antikörper (anti-EGFR-IgG1 und -IgG3 / ktrl-IgG1 und -IgG3) aufgereinigt. Im nächsten Schritt erfolgte mit Hilfe einer Größenausschlusschromatographie die Präparation von monomeren rekombinanten Antikörpern. Für die Präparation von anti-EGFR-IgG1 wurde nach der Affinitätschromatographie in der Größenausschlusschromatographie nur ein einziges Absorptionsmaximum bei 12,3 ml detektiert (Abbildung 18/A). Eine weitere chromatographische Aufreinigung dieses Antikörpers war nicht nötig, da mit Hilfe einer Gelfiltrations-Eichung ein Molekulargewicht von 162 kDa errechnet werden konnte. Dies deutete darauf hin, dass das ermittelte Absorptionsmaximum für reinen monomeren anti-EGFR-IgG1 steht (Tabelle 16).

Tabelle 16. Charakteristika der Gelfiltrationsläufe

Antikörper	Elutionsvolumen „Monomer“ in [ml]	Molekulargewicht in kDa]
anti-EGFR-IgG1	12,3	162
anti-EGFR-IgG3	11,4	214
ktrl-IgG1	13	133
ktrl-IgG3	12,0	183

Ergebnisse

Während der Größenausschlusschromatographischen Auftrennung vom ktrl-IgG1 wurden insgesamt zwei unterschiedliche Absorptionsmaxima ermittelt (Abbildung 18/B). Das erste lag bei 13 ml und umfasste Proteine einer Molekülgröße von 133 kDa, so dass es sich hierbei um die ktrl-IgG1 Monomer-haltigen Fraktionen handeln könnte. Das zweite Absorptionsmaximum wurde bei 16,4 ml bestimmt und umfasste niedrigmolekulare Proteine von 47 kDa.

Die Gelfiltration des anti-EGFR-IgG3 zeigte neben einem Absorptionsmaximum bei 11,4 ml zwei weitere bei 8,2 ml und 9,5 ml (Abbildung 18/C). Die Berechnungen mittels Eichgerade ergaben, dass das Maximum bei 11,4 ml Proteine eines Molekulgewichts von 214 kDa (Tabelle 16), das bei 8,2 ml Proteine eines Molekulgewichts von 561 kDa und das bei 9,5 ml Proteine eines Molekulgewichts von 375 kDa Dalton umfasste. Die anti-EGFR-IgG3 Monomere eluierten daher bei 11,4 ml. Die restlichen Absorptionsmaxima stellten Aggregate aus hochmolekularen Polymeren dar.

Für die Präparation vom ktrl-IgG3 wurden in der Größenausschlusschromatographie drei verschiedene Absorptionsmaxima bei 8,7 ml, 12 ml und 16,8 ml detektiert (Abbildung 18/D). Das erste Absorptionsmaximum umfasste Proteine einer Molekülgröße von 491 kDa und stellte somit ein Gemisch aus polymeren Strukturen dar. Die Berechnungen mittels Eichgerade ergaben, dass das Maximum bei 12 ml Proteine eines Molekulgewichts von 183 kDa (Tabelle 16), das bei 16,8 ml hingegen Proteine eines Molekulgewichts von 43 kDa umfasste. Auf Grund der ermittelten Proteingrößen eluierten die monomeren ktrl-IgG3 Antikörper daher bei 12 ml.

Im Folgenden wurden die potentiell Monomer-haltigen Fraktionen vereint und einer weiteren Größenausschlusschromatographie unterzogen. Ein erneutes Auftreten polymerer Strukturen konnte nach der zweiten Größenausschlusschromatographie nicht beobachtet werden. Während für den anti-EGFR-IgG3 und ktrl-IgG3 keine Absorptionsmaxima niedrigmolekularer Proteine mehr auftraten, konnte jedoch für den ktrl-IgG1 weiterhin eine leichte Kontamination mit niedrigmolekularen Proteinen einer Größe von circa 47 kDa beobachtet werden.

Ergebnisse

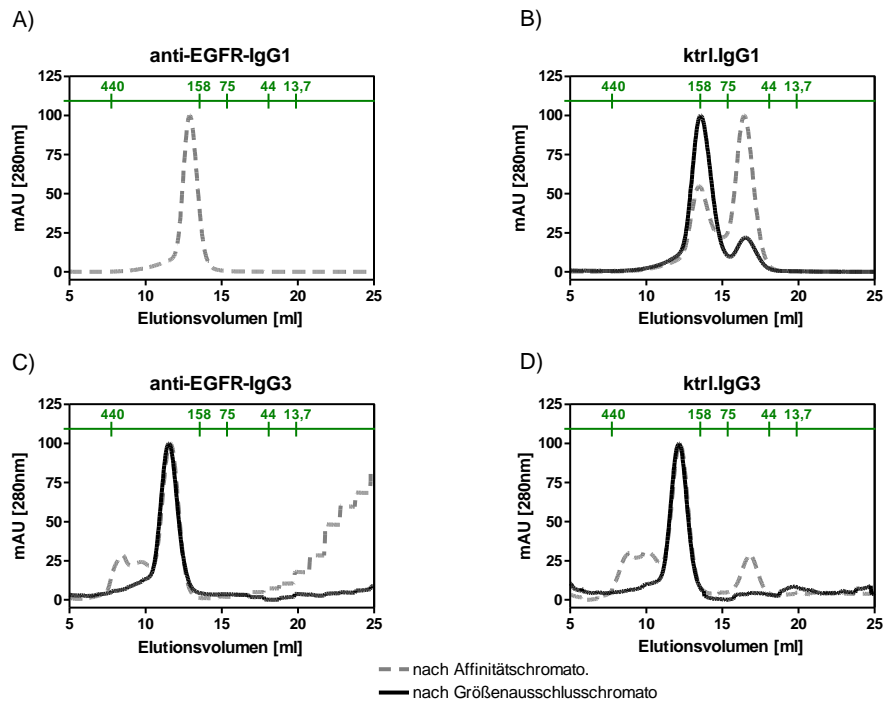


Abbildung 18. Größenausschlusschromatographie der EGFR-gerichteten Antikörper und Kontrollantikörper. Antikörperpräparationen wurden mittels Gelfiltration aufgereinigt und analysiert. In grau sind die Elutionsprofile nach der Affinitätschromatographie und in schwarz nach der ersten Größenausschlusschromatographie dargestellt. In grün ist die ermittelte Gelfiltrationseichgerade, inklusive der Molekülgrößen (kDa), dargestellt.

Im nächsten Schritt wurden die Diagramme der Elutionsprofile von anti-EGFR-IgG1 und anti-EGFR-IgG3, bzw. von ktrl-IgG1 und ktrl-IgG3, nach der zweiten Größenausschlusschromatographie übereinander gelegt. In Abbildung 19 ist deutlich zu erkennen, dass die jeweilige IgG3-Antikörper-Variante früher eluiert werden konnten als die IgG1-Variante. Dies spiegelt das höhere Molekulargewicht des IgG3, bedingt durch die längere *hinge* Region, im Vergleich zum IgG1 Antikörper wieder.

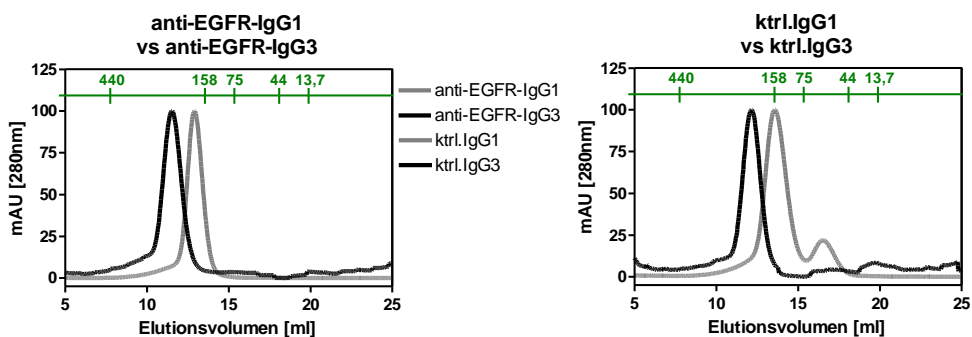


Abbildung 19. Vergleich der Elutionsprofile von EGFR-gerichteten IgG1- und IgG3-Antikörpern, sowie der Kontrollantikörper. Überlagerung von Elutionsprofilen der Antikörperpräparationen (anti-EGFR-IgG1, anti-EGFR-IgG3, ktrl-IgG1 und ktrl-IgG3). In grau sind die Elutionsprofile der IgG1- und in schwarz der IgG3-Antikörper dargestellt. In grün ist die ermittelte Gelfiltrationseichgerade, inklusive der Molekülgrößen (kDa), dargestellt.

Im Folgenden wurden die potentiell monomeren Antikörperpräparationen auf Reinheit und Proteinmenge mittels biochemischer Methoden (SDS-PAGE, Western Blot und automatischer Kapillarelektrophorese) analysiert.

4.1.4 Reinheitsanalyse und Quantifizierung der Antikörper

Zur biochemischen Überprüfung der Intaktheit und Reinheit der EGFR-gerichteten Antikörper, sowie der Kontrollantikörper wurden die Proteinpräparationen mittels SDS-PAGE unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen analysiert. Abbildung 20 zeigt die Ergebnisse der gelelektrophoretischen Auftrennung. Unter reduzierenden Bedingungen (Abbildung 20/A) konnten für alle Antikörper zwei unterschiedliche Banden detektiert werden. Für den ktrl-IgG1 (Spur 1 und Spur 2 /A), wie auch für den anti-EGFR-IgG1 (Spur 3 und Spur 4 /A) ist die erste Proteinbande bei ca. 50 kDa zu erkennen. Dies entspricht dem Molekulargewicht der schweren Kette eines IgG1-Antikörpers (absolute Molekülmasse (c2B8-VH-IgG1) = 49,3 kDa / absolute Molekülmasse (225-VH-IgG1) = 49,3 kDa).

Die zweite erkennbare Proteinbande bei den IgG1-Antikörpern wurde bei ca. 25 kDa detektiert. Hierbei handelte es um die leichte Kette eines IgG1-Antikörpers, da das kalkulierte Molekulargewicht für c2B8-VL-Kappa bei 24,2 kDa und für 225-VL-Kappa bei 23,8 kDa lag. Für den ktrl-IgG3 (Spur 5 und Spur 6 /A), wie auch für den anti-EGFR-IgG3 (Spur 7 und Spur 8 /A) war die erste Proteinbande bei etwas über 50 kDa zu erkennen, so dass es sich demnach um die schweren Ketten der IgG3-Antikörper handelte, da das kalkulierte Molekulargewicht der schweren Ketten beider IgG3-Antikörper bei 56 kDa lag. Zusätzlich wurde am Laufverhalten deutlich, dass die schweren Ketten der IgG3-Antikörper größer sind als die der IgG1-Antikörper.

Die zweite erkennbare Proteinbande bei den IgG3-Antikörpern wurde bei circa 25 kDa detektiert. Hierbei handelt es sich, wie schon bei den IgG1-Antikörpern, um die leichte Kette. Zur weiteren Verifizierung der Integrität und Reinheit wurden die Antikörper unter nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetrennt (Abbildung 20/B). Für die Antikörpermoleküle konnte unter diesen Bedingungen nur eine einzige Proteinbande detektiert werden. Die IgG1-Antikörper-Banden (Spur 1 bis 4 /B) liefen etwas über 150 kDa. Dies entsprach circa der absolute Molekülmasse (ktrl-IgG1 = 147 kDa / anti-EGFR-IgG1 = 146 kDa). Die detektierten Banden der IgG3-Antikörper (Spur 5 bis 8 /B) lagen, wie an Hand des größeren IgG3-Molekulargewichts zu erwarten, über den IgG1-Antikörper-Banden. Die Größen entsprachen ungefähr der absolute Molekülmasse für IgG3-Antikörper (ktrl-IgG3 = 160,2 kDa / anti-EGFR-IgG3 = 159,6 kDa).

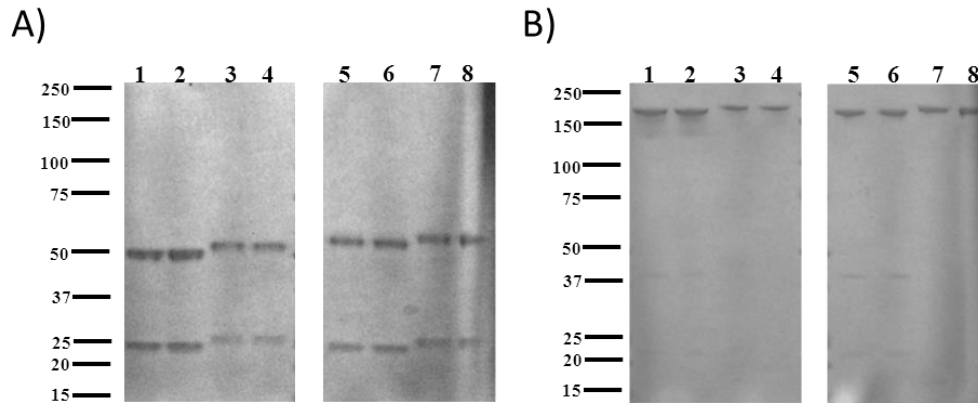


Abbildung 20. Gelelektrophoretische Auftrennung der monomeren Antikörperpräparationen (anti-EGFR-mAks und Kontroll-mAks). anti-EGFR-IgG1 und anti-EGFR-IgG3, sowie ktrl-IgG1 und ktrl-IgG3 Monomere wurden unter reduzierenden (A) oder nicht-reduzierenden (B) Bedingungen in einer SDS-PAGE aufgetrennt und die Gele anschließend mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. Spur 1 und Spur 2: ktrl-IgG1; Spur 3 und Spur 4: anti-EGFR-IgG1; Spur 5 und Spur 6: ktrl-IgG3; Spur 7 und Spur 8: anti-EGFR-IgG3

Darüber hinaus wurden die einzelnen präparierten Antikörpermoleküle mittels Western Blot Analysen auf ihre korrekte Zusammensetzung untersucht. Daher wurden potentielle Antikörpermonomere unter denaturierenden, nichtreduzierenden Bedingungen aufgetrennt und nach dem Transfer auf die PVDF-Membran mit polyklonalen Antikörpern, entweder gegen humane Kappa leichte Ketten (Abbildung 21./A) oder gegen humanes IgG (Abbildung 21/B), detektiert. Für die EGFR-gerichteten-Antikörper wie auch den ktrl-IgG3 (Spur 2, Spur 3 und Spur 4) konnte mittels Leichtketten- sowie Schwereketten-Detektion jeweils nur eine einzige Proteinbande detektiert werden, wobei die Proteinbanden ein nahezu identisches Laufverhalten wie in der SDS-PAGE aufwiesen. Somit zeigten diese Antikörperpräparationen eine ausreichende Integrität und Reinheit für eine funktionelle Charakterisierung auf.

Im Gegensatz zu den übrigen Antikörpern konnten für ktrl-IgG1 (Spur 1) mehrere Proteinbanden sowohl mittels Leichtketten-Detektion wie auch mittels Schwereketten-Detektion nachgewiesen werden. Die oberste Proteinbande in der ktrl-IgG1-Auftrennung entsprach ungefähr dem kalkulierten Molekulargewicht eines IgG1-Moleküls, die übrigen Banden umfassten Proteine von einem niedrigeren Molekulargewicht, wobei interessanterweise wiederum eine Bande zwischen 50 und 37 kDa detektiert wurde. Bei diesen Proteinen könnte es sich wiederum um die gleichen Proteine handeln, welche während der Größenausschlusschromatographie der ktrl-IgG1 Antikörper bei circa 50 kDa eluierten. Des Weiteren könnten diese zusätzlichen Proteinbanden einerseits an einer unzureichenden Glykosylierung dieser Antikörperpräparationen liegen. Andererseits könnte es sich bei diesen zusätzlichen Banden um Protein-Artefakte handeln, welche durch die denaturierenden Bedingungen entstehen.

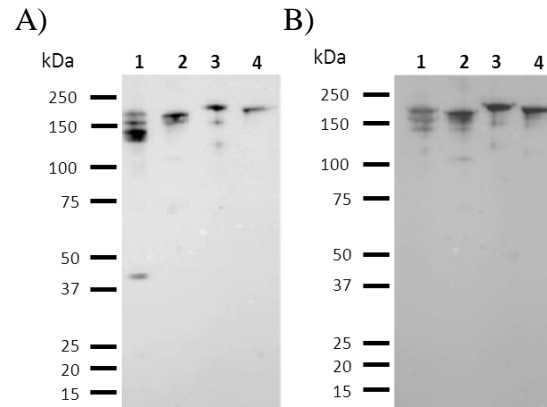


Abbildung 21. Western Blot der monomeren Antikörperpräparationen (anti-EGFR-mAks und Kontroll-mAks). anti-EGFR-IgG1 und anti-EGFR-IgG3, bzw. ktrl-IgG1 und ktrl-IgG3 Monomere wurden unter nicht-reduzierenden Bedingungen in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend erfolgte der Transfer auf eine PVDF Membran. Zur Detektion wurde ein HRP-konjugierter anti-humane-Kappa-Leichtketten Antikörper (A) oder ein HRP-konjugierter anti-humanes-IgG Antikörper (B) verwendet. Spur 1: ktrl-IgG1; Spur 2: anti-EGFR-IgG1; Spur 3: anti-EGFR-IgG3; Spur 4: ktrl-IgG3.

Zur finalen Reinheitsanalyse und Bestimmung der exakten Proteinkonzentration wurde die Experion-Technologie verwendet. Hierbei wurden die anti-EGFR-IgG1 und -IgG3 sowie die Kontrollantikörper in einer automatisierten Kapillargelelektrophorese aufgetrennt. Die erhaltenen Elektropherogramme wurden daraufhin zu virtuellen Gelen (Abbildung 22) umgerechnet. Die Areale unter den Elektropherogrammen wurden kalkuliert und für die Bestimmung der Proteinkonzentration und Reinheit in Relation zu internen Systemreferenzmarkern verwendet. Für alle Antikörperpräparationen wurde nur eine Bande detektiert. Für den anti-EGFR-IgG1 (Spur 1 und Spur 2) ergab die Bande ein Molekulargewicht von 185 kDa, für den anti-EGFR-IgG3 (Spur 3 und Spur 4) ein Molekulargewicht von 216 kDa, für den ktrl-IgG1 (Spur 5 und Spur 6) ein Molekulargewicht von 177 kDa und für den ktrl-IgG3 (Spur 7 und Spur 8) ein Molekulargewicht von 203 kDa. Im Vergleich zu den übrigen biochemischen Methoden (SDS-PAGE, Western Blot und Größenausschlusschromatographie) wurden mit Hilfe der Experion-Technologie die größten molekularen Gewichte der Antikörper bestimmt. An Hand der durch die Experion-Technologie bestimmten Proteinkonzentrationen wurden die Antikörper-Präparationen auf 200 µg/ml für IgG1-Antikörper und auf 215 µg/ml für IgG3-Antikörper eingestellt, so war gewährleistet, dass innerhalb der folgenden Experimente IgG1 und IgG3 Antikörper immer die gleiche Molarität erreichten.

Ergebnisse

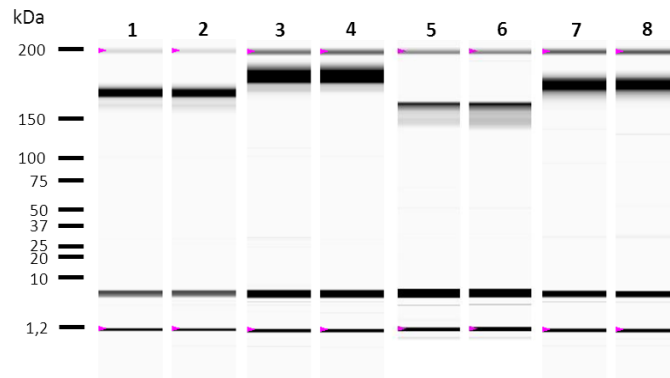


Abbildung 22. Automatische Kapillargelelektrophorese der monomeren Antikörperpräparationen (anti-EGFR-mAks und Kontroll-mAks). anti-EGFR-IgG1 und anti-EGFR-IgG3, sowie ktrl-IgG1 und ktrl-IgG3 Monomere wurden unter nicht-reduzierenden Bedingungen mittels der Experion-Technologie aufgetrennt und analysiert. Spur 1 und Spur 2: anti-EGFR-IgG1; Spur 3 und Spur 4: anti-EGFR-IgG3; Spur 5 und Spur 6: ktrl-IgG1; Spur 7 und Spur 8: ktrl-IgG3

Das leicht unterschiedliche Laufverhalten zwischen ktrl-IgG1 und anti-EGFR-IgG1, bzw. zwischen ktrl-IgG3 und anti-EGFR-IgG3, welches mittels der verschiedenen biochemischen Methoden beobachtet werden konnte, liegt an der Glykosylierung in den variablen Domänen. Die variablen Domänen der EGFR-gerichteten Antikörper beinhalten im Gegensatz zu den der Kontrollantikörper eine zusätzliche Glykosylierung.

4.2 Funktionelle Charakterisierung der generierten Antikörper

Im nächsten Abschnitt wurde die IgG3-Variante des therapeutischen Antikörpers Cetuximab in Bezug auf ihre Fähigkeit, Fab-vermittelte Effekte und CDC zu induzieren, untersucht. Des Weiteren sollte die Initiation der Kaskade durch den EGFR gerichteten IgG3-Antikörper, die Ausbildung der C3- und C5-Konvertasen wie auch die Entstehung des MACs detailliert analysiert werden.

4.2.1 Fab-vermittelte Effekte

Im Folgenden wurden die Affinitäten zum EGFR der einzelnen rekombinanten Antikörper mittels einer indirekten Immunfluoreszenz auf den A431 und DiFi Tumorzellen untersucht. Mit steigender Antikörperkonzentration konnte nachgewiesen werden, dass anti-EGFR-IgG1 und -IgG3 ähnliche Bindungsaffinitäten aufwiesen (Abbildung 23). Die Kontrollantikörper zeigten keinerlei Bindung an EGFR.

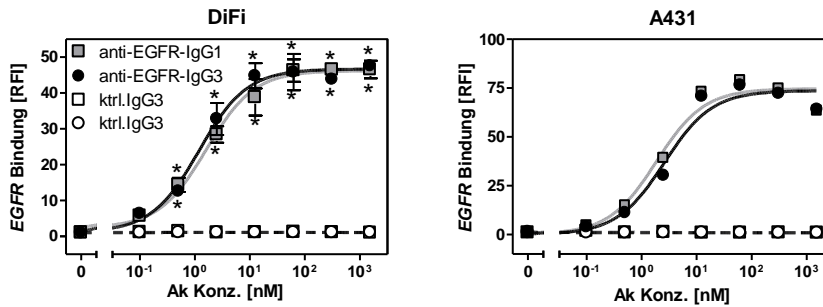


Abbildung 23 Konzentrationsabhängige Bindung von EGFR-gerichteten Antikörpern an den EGFR. Zielantigenbindung durch anti-EGFR-IgG1, anti-EGFR-IgG3 und Kontrollantikörper wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz bestimmt. Als Zielzellen fungierten A431 oder DiFi Tumorzellen. Dargestellt sind für die Experimente mit der DiFi Zelllinie Mittelwerte mit Standardfehlern von drei unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) zwischen Kontrollantikörpern und spezifischen Antikörpern sind mit * gekennzeichnet.

Ein weiterer Fab-vermittelter Effekt, neben der Zielantigenbindung, ist die Inhibition des Tumorzellwachstums. Im vorliegenden Versuchsaufbau stellte 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 EGFR-gerichteten Antikörper in Zellviabilitätstests mit der DiFi Zielzelle getestet (Abbildung 24).

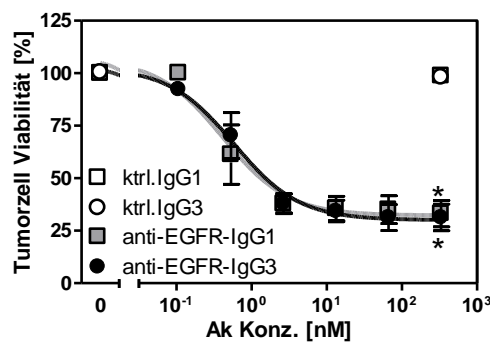


Abbildung 24. Konzentrationsabhängige Wachstumsinhibition durch EGFR-gerichtete Antikörpern gegenüber DiFi Zellen. Wachstumsinhibition durch anti-EGFR-IgG1, anti-EGFR-IgG3 und Kontrollantikörper wurde mittels des MTS Zellviabilitätstests bestimmt. Als Zielzellen fungierten DiFi Tumorzellen. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehlern von drei unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) zwischen Kontrollantikörpern und spezifischen Antikörpern sind mit * gekennzeichnet.

Dabei zeigten anti-EGFR-IgG1 als auch anti-EGFR-IgG3 eine ähnlich signifikante Effektivität, wobei das Tumorzellwachstums um $66,9 \pm 6,3$ % (anti-EGFR-IgG1 / $EC_{50} = 0,41 \pm 0,18$ nM) und $68,7 \pm 6,4$ % (anti-EGFR-IgG3 / $EC_{50} = 0,58 \pm 0,15$ nM) reduziert werden konnte. Kontrollantikörper hatten keinerlei Einfluss auf das Tumorzellwachstum.

4.2.2 anti-EGFR-Ig3 induziert komplementvermittelte Zellyse

Um den Einfluss der EGFR-Expression auf anti-EGFR-IgG1 und anti-EGFR-IgG3 induzierte Komplementaktivierung zu untersuchen, wurden EGFR-transfizierte BHK21 Zellen (BHK-EGFR⁺) verwendet. Diese verwendeten Zellen exprimierten in unterschiedlichen Maße EGFR (EGFR Expression = #1 < #2 < #3 < #4 < #5) (Derer et al.2012). Um unterschiedliche EGFR-Bindungseigenschaften auszuschließen, wurde für jede Zelllinie eine konzentrationsabhängige Bindung mit anti-EGFR-IgG1, anti-EGFR-IgG3 wie auch mit Kontrollantikörpern durchgeführt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede im EGFR-Bindungsverhalten zwischen anti-EGFR-IgG1 und anti-EGFR-IgG3 festgestellt werden (Abbildung 25). Die einzige Ausnahme stellte die Konzentration 0,53 nM bei der BHK-EGFR⁺ Zelllinie #3 dar, da hier der anti-EGFR-IgG1 eine MFI von 13.4 ± 0.2 und der anti-EGFR-IgG3 eine MFI von 7.55 ± 2.75 aufwies. Die Kontrollantikörpern zeigten keine Bindung an die EGFR-positiven BHK-Zellen.

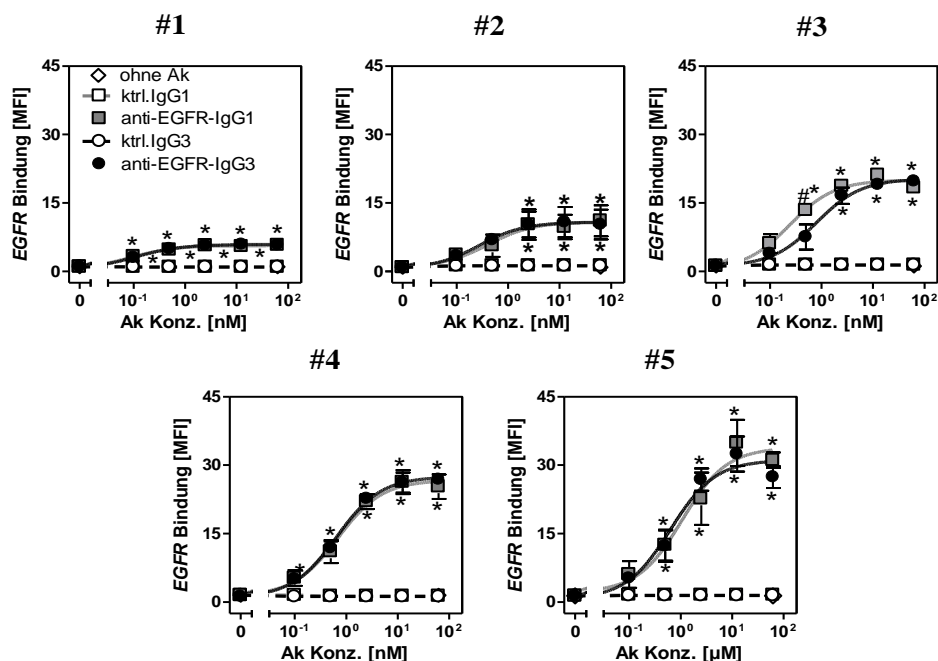


Abbildung 25. Konzentrationsabhängige Bindung EGFR-gerichteter Antikörper an EGFR-transfizierte BHK-21 Zellen. Zielantigen-Bindung durch anti-EGFR-IgG1, anti-EGFR-IgG3 und Kontrollantikörper wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz bestimmt. Als Zielzellen fungierten BHK-EGFR⁺ #1, #2, #3, #4 oder #5 Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehlern von drei unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) zwischen Kontrollantikörpern und spezifischen Antikörpern sind mit *, zwischen anti-EGFR-IgG1 und anti-EGFR-IgG3 mit # gekennzeichnet.

Nachdem die EGFR-gerichteten IgG1- und IgG3-Antikörper ähnliche Bindungseigenschaften aufwiesen, wurde in den folgenden Experimenten ihre Fähigkeit zur Induktion der CDC

Ergebnisse

analysiert. Die BHK-EGFR⁺ Zelllinien fungierten als Zielzellen in *CDC*-Experimenten (Abbildung 26). Hierbei diente humanes Serum (25 % v/v) als Komplementquelle. Im Gegensatz zum anti-EGFR-IgG1, konnte eine signifikante konzentrationsabhängige *CDC* für den anti-EGFR-IgG3 gegenüber BHK-EGFR⁺ Zellen #3, #4 und #5 gezeigt werden. *CDC* durch anti-EGFR-IgG3 konnte gegenüber den BHK-EGFR⁺ Zellen #1 und #2 nicht gezeigt werden. Die Kontrollantikörper induzierten keine *CDC*.

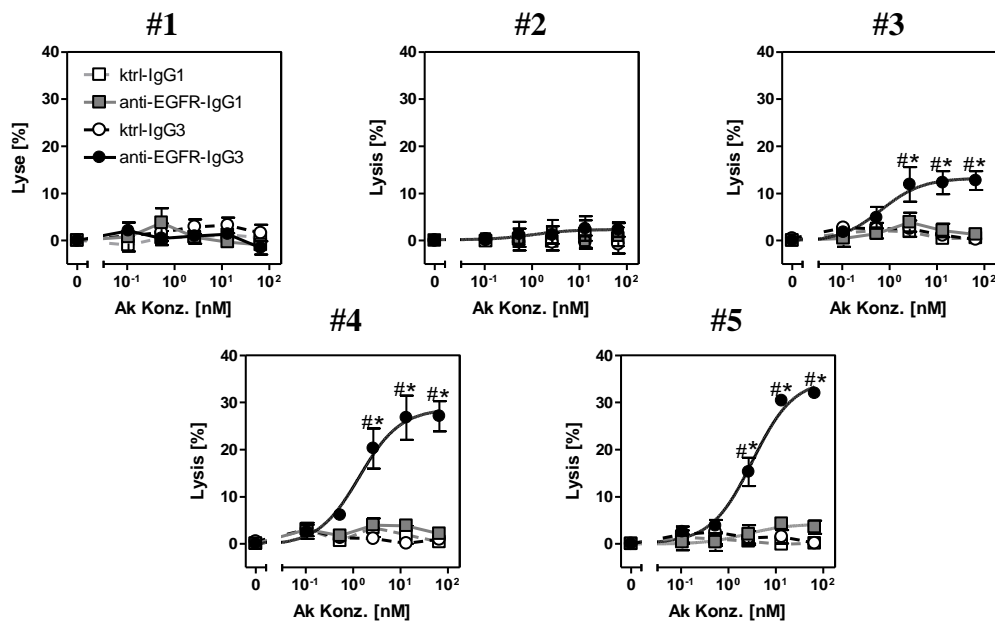


Abbildung 26. EGFR-gerichtete Antikörper induzierte *CDC* gegenüber BHK-EGFR⁺ Zellen. *CDC* Induktion durch anti-EGFR-IgG1, anti-EGFR-IgG3 oder Kontrollantikörper gegenüber BHK-EGFR⁺ #1, #2, #3, #4 oder #5 Zellen wurde mittels ⁵¹Chrom-Freisetzungstest mit unterschiedlichen Blutspendern bestimmt. Als Quelle des Komplementsystems diente humanes Serum (25 % v/v). Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehlern von drei unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) zwischen Kontrollantikörpern und spezifischen Antikörpern sind mit *, zwischen anti-EGFR-IgG1 und anti-EGFR-IgG3 mit # gekennzeichnet.

Um zu untersuchen, ob die Resultate mit den BHK-EGFR⁺ Zellen auf humane Tumorzelllinien zu übertragen waren, wurden im folgenden *CDC*-Experimente mit den humanen Tumorzelllinien A431, DiFi und A1207 durchgeführt (Abbildung 27). anti-EGFR-IgG3 induzierte die effektivste *CDC* gegenüber DiFi Zellen (35.2 ± 3.1 % maximale Lyse), gefolgt von A1207 Zellen (11.8 ± 1.8 % maximale Lyse). Interessanter Weise konnte keine *CDC* gegenüber A431 Zellen durch den EGFR-gerichteten IgG3-Antikörper beobachtet werden. Der anti-EGFR-IgG1 und die Kontrollantikörper zeigten keine signifikante *CDC* gegenüber den verwendeten Tumorzelllinien.

Ergebnisse

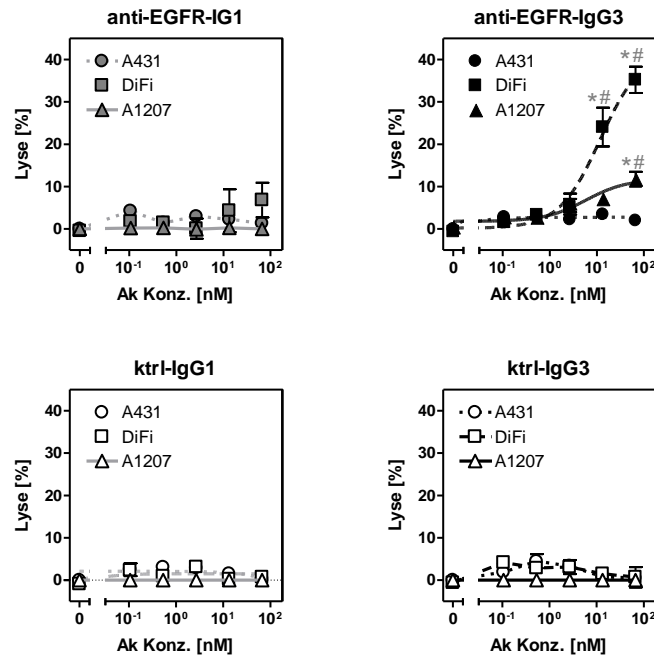


Abbildung 27. EGFR-gerichtete Antikörper induzierte CDC gegenüber humanen Tumorzelllinien. CDC Induktion durch anti-EGFR-IgG1, anti-EGFR-IgG3 oder Kontrollantikörpern gegenüber A431, DiFi und A1207 Tumorzellen wurde mittels ⁵¹Chrom-Freisetzungstest mit unterschiedlichen Blutspendern bestimmt. Als Quelle des Komplementsystems diente humanes Serum (25 % v/v). Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehlern von drei unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) zwischen Kontrollantikörpern und spezifischen Antikörpern sind mit *, zwischen anti-EGFR-IgG1 und anti-EGFR-IgG3 mit # gekennzeichnet.

Zur weiteren Analyse der anti-EGFR-IgG3 induzierten Komplementaktivierung wurde der Einfluss der EGFR-Expression auf die anti-EGFR-IgG3 induzierte CDC untersucht. Hierfür wurden die EGFR Moleküle auf den einzelnen Zelllinien (A431, A1207, DiFi und BHK-EGFR+ #31) mittels kalibrierter Durchflusszytometrie bestimmt. Es konnte keine Korrelation zwischen maximaler Lyse und EGFR-Expression festgestellt werden, da alle verwendeten Zelllinien eine ähnliche EGFR-Expression aufwiesen (Abbildung 28).

A)

Expression	A431	DiFi	A1207	BHK-EGFR ⁺
SABC				#5
EGFR	1.151.902	1.065.787	976.591	1.056.119
	± 105.090	± 64.659	± 23.217	± 64.789

*SABS = spezifische Antikörper Bindestellen / Zelle

B)

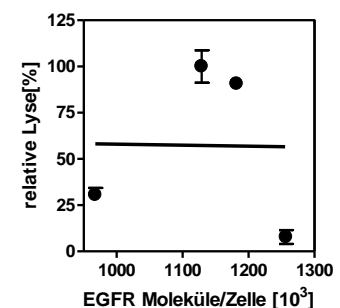


Abbildung 28. Korrelation von EGFR-Expression und relativer Lyse bei Komplementaktivierung durch anti-EGFR-IgG3. A) Quantifizierung der EGFR Moleküle auf den verwendeten Tumorzelllinien. B) Korrelation zwischen EGFR-Expression und relativer Lyse.

4.2.3 Komplement Anlagerung durch anti-EGFR-IgG1 und -IgG3

Interessanter Weise induzierte der anti-EGFR-IgG3 CDC gegenüber DiFi und den BHK-EGFR⁺ #5 Zellen, aber nicht gegenüber A431 Zellen, obwohl diese Zellen eine identische EGFR-Expressionshöhe aufwiesen. Daher sollte im Folgenden die Anlagerung von Komplementkomponenten, induziert durch die EGFR-gerichteten Antikörper, auf diesen Zielzellen (A431 / DiFi / BHK-EGFR⁺ #5) untersucht werden. Unterschiede in der Anlagerung von Komplementkomponenten könnten Aufschluss geben, ob für die untersuchten Antikörper eine unterschiedliche Komplementaktivierung zu Grunde liegt. Während dieser Experimente diente eine Kombination aus zwei nicht-epitopüberlappenden EGFR-gerichteten IgG1 Antikörpern als Positivkontrolle. Der anti-EGFR-IgG3 wurde daraufhin mit den anti-EGFR-IgG1 wie auch mit der Positivkontrolle in Bezug auf die Anlagerung von Komplementkomponenten verglichen. anti-EGFR-IgG3 vermittelte eine signifikant stärkere C1q-Anlagerung als die Positivkontrolle (für A431 und DiFi), wobei die C1q-Anlagerung an BHK-EGFR⁺ #5 Zellen nicht signifikant unterschiedlich zwischen anti-EGFR-IgG3 und der Positivkontrolle war. Anti-EGFR-IgG1 induzierte keine C1q-Anlagerung (Abbildung 29 und im Anhang **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**).

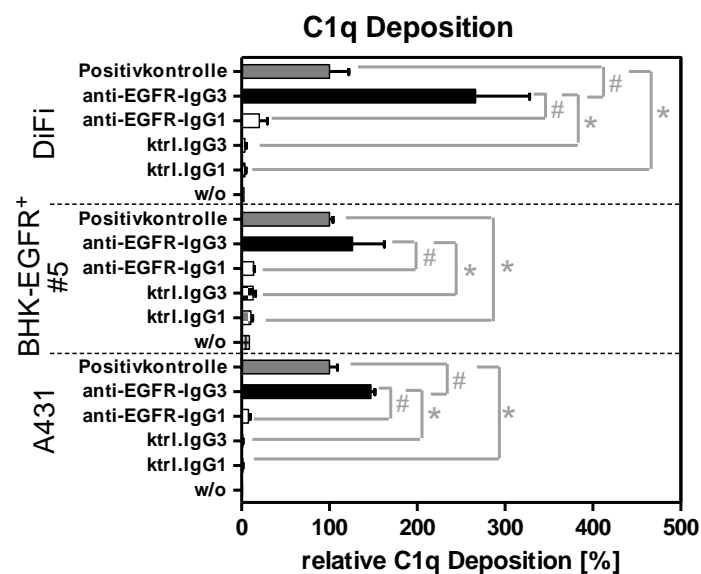


Abbildung 29. EGFR-gerichtete Antikörper vermittelte C1q Anlagerung auf A431, DiFi und BHK-EGFR⁺ #5. Deposition von C1q wurde in Gegenwart von humanem Serum (25 % v/v) unterschiedlicher Blutspender und EGFR-gerichteten Antikörpern oder Kontrollantikörpern (66,66 nM anti-EGFR-IgG1, -IgG3 und Kontrollantikörper / 33,33 nM der EGFR-gerichteten mAk der Positivkontrolle) mittels direkter Immunfluoreszenz analysiert. Relative Deposition wurde anhand der durch die Positivkontrolle generierten RFI berechnet, indem die RFI der Positivkontrolle gleich 100 % gesetzt wurde. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehlern von drei unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) zwischen Kontrollantikörpern und spezifischen Antikörpern sind mit *, zwischen anti-EGFR-IgG1 und anti-EGFR-IgG3 bzw. der Positivkontrolle mit # gekennzeichnet.

Ergebnisse

Im nächsten Schritt wurde die C4 (b/c) Anlagerung durch EGFR-gerichtete Antikörper, Kontrollantikörper und die Positivkontrolle untersucht. Interessanterweise induzierte anti-EGFR-IgG3, trotz der sehr hohen C1q-Anlagerung, eine signifikant geringere C4(b/c) Anlagerung auf den Zielzellen (A431 / A1207 und BHK-EGFR⁺ #5) als die Positivkontrolle. Im Vergleich mit anti-EGFR-IgG1 lagerte anti-EGFR-IgG3 jedoch signifikant mehr C4 (b/c) an die Zielzellen an (Abbildung 30 und im Anhang **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**).

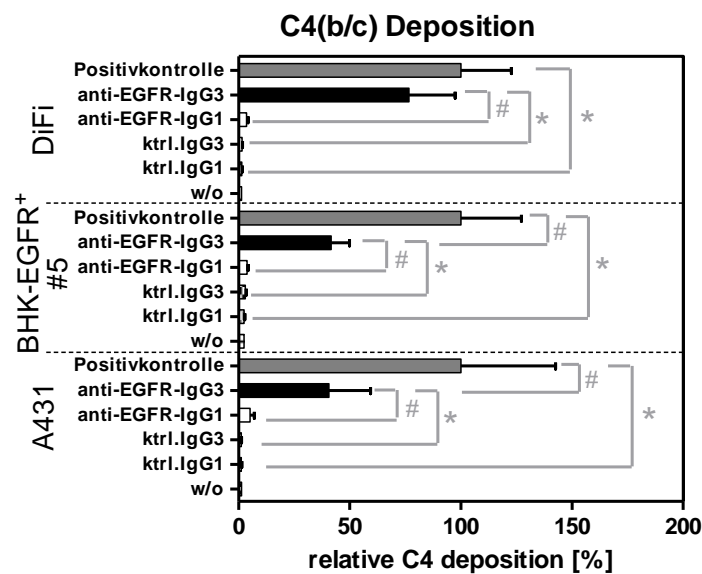


Abbildung 30. EGFR-gerichtete Antikörper vermittelte C4(b/c) Anlagerung auf A431, DiFi und BHK-EGFR⁺ #31. C4(b/c) Anlagerung wurde in Gegenwart von human Serum (25 % v/v) als Komplementquelle und EGFR-gerichteten Antikörpern oder Kontrollantikörpern (66,66 nM anti-EGFR-IgG1,-IgG3 und Kontrollantikörper / 33,33 nM jeder EGFR-gerichtete mAk der Positivkontrolle) mittels direkter Immunfluoreszenz analysiert. Relative Deposition wurde anhand der durch die Positivkontrolle generierten RFI berechnet, indem die RFI der Positivkontrolle gleich 100 % gesetzt wurde. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehlern von drei unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) zwischen Kontrollantikörpern und spezifischen Antikörpern sind mit *, zwischen anti-EGFR-IgGg1 und anti-EGFR-IgG3 bzw. der Positivkontrolle mit # gekennzeichnet.

Im nächsten Experiment wurde daraufhin die C3b-Anlagerung untersucht. Im Gegensatz zur C4(b/c) Anlagerung induzierten anti-EGFR-IgG3 und die Positivkontrolle im gleichen Maße eine (i)C3(b) Deposition. Im Vergleich mit dem anti-EGFR-IgG1 und den Kontrollantikörpern zeigten sowohl der anti-EGFR-IgG3 als auch die Positivkontrolle eine signifikant höhere (i)C3(b) Anlagerung (Abbildung 31 und im Anhang **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**).

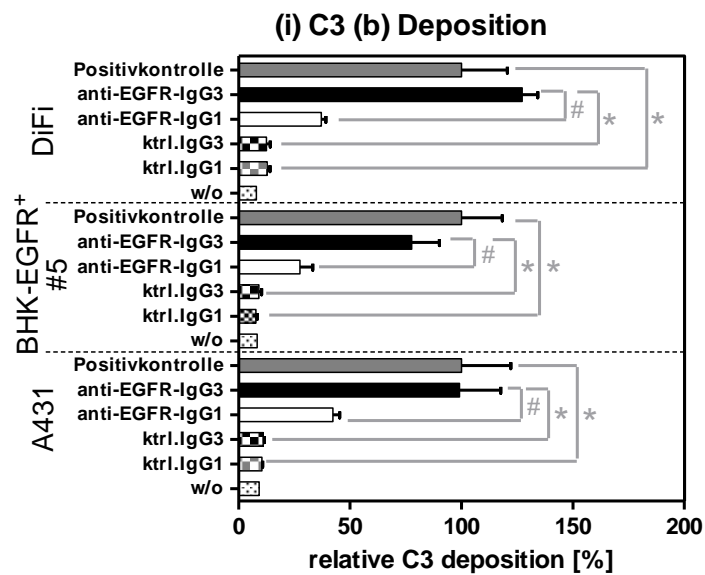


Abbildung 31. EGFR-gerichtete Antikörper vermittelte (i)C3(b) Anlagerung auf A431, DiFi und BHK-EGFR+ #31. Die iC3(b) Deposition wurde in Gegenwart von human Serum (25 % v/v) als Quelle des Komplementsystems und EGFR-gerichteten Antikörpern oder Kontrollantikörpern (66,66 nM anti-EGFR-IgG1,-IgG3 und Kontrollantikörper / 33,33 nM jeder EGFR-gerichtete mAk der positiv Kontrolle) mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert. Relative Deposition wurde anhand der durch die Positivkontrolle generierten RFI berechnet, indem die RFI der Positivkontrolle gleich 100 % gesetzt wurde. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehlern von drei unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) zwischen Kontrollantikörpern und spezifischen Antikörpern sind mit *, zwischen anti-EGFR-IgGg1 und anti-EGFR-IgG3, bzw. der Positivkontrolle mit # gekennzeichnet.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der anti-EGFR-IgG3 signifikant mehr Faktor Bb an die A431 und DiFi Zellen anzulagern vermochte als die Positivkontrolle und anti-EGFR-IgG1. Im Gegensatz dazu bewirkte der anti-EGFR-IgG3 eine signifikant niedrigere Faktor Bb Anlagerung an BHK-EGFR⁺ #5 als die Positivkontrolle, was darauf schließen lässt, dass anti-EGFR-IgG3 eine stärkere Aktivierung des alternativen Komplementweges auf A431 und DiFi Zellen im Gegensatz zu BHK-EGFR⁺ #5 bewirkte (Abbildung 32 und im Anhang **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**).

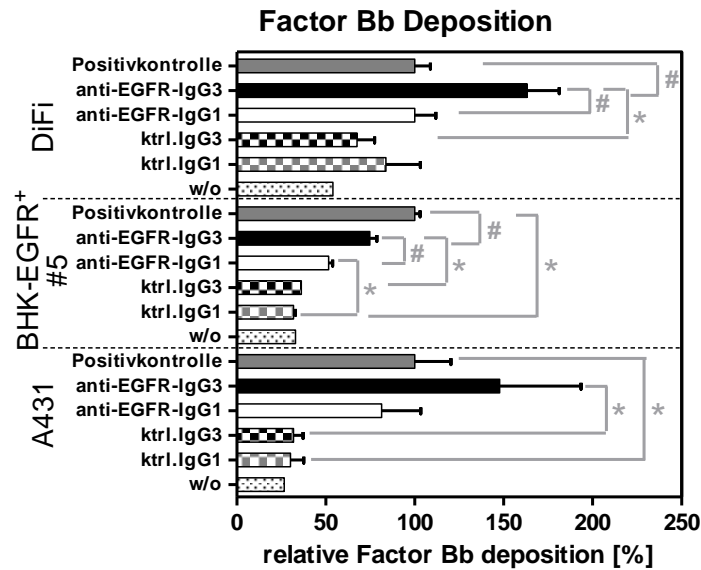


Abbildung 32. EGFR-gerichtete Antikörper vermittelte Faktor Bb Anlagerung auf A431, DiFi und BHK-EGFR+ #31. Anlagerung von Faktor Bb wurde in Gegenwart von human Serum (25 % v/v) als Ressource für Bestandteile des Komplementsystems und EGFR-gerichteten Antikörpern oder Kontrollantikörpern (66,66 nM anti-EGFR-IgG1, -IgG3 und Kontrollantikörper / 33,33 nM jeder EGFR-gerichtete mAk der Positivkontrolle) mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert. Relative Deposition wurde anhand der durch die Positivkontrolle generierten RFI berechnet, indem die RFI der Positivkontrolle gleich 100 % gesetzt wurde. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehlern von drei unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) zwischen Kontrollantikörpern und spezifischen Antikörpern sind mit *, zwischen anti-EGFR-IgG1 und anti-EGFR-IgG3, bzw. der Positivkontrolle mit # gekennzeichnet.

Im nächsten Schritt wurde die C5b-9 Deposition beziehungsweise die Insertion des Membranangriffskomplexes in die Zielzellmembran durch die einzelnen Antikörper, analysiert. Anti-EGFR-IgG3 vermittelte eine signifikante Insertion von C5b-9 in die Zellmembran von DiFi und BHK-EGFR⁺ #5 Zellen, aber nicht in die Membran von A431. Eine signifikant höhere C5b-9 Deposition konnte für die Positivkontrolle nachgewiesen werden. Im Gegensatz zur Positivkontrolle und dem anti-EGFR-IgG3 konnte keine signifikante Anlagerung von Komplementkomponenten (C1q, C4b/c, iC3b, Faktor Bb und C5b-9) auf die drei untersuchten Zelllinien für den anti-EGFR-IgG1 wie auch für die Kontrollantikörper gezeigt werden (

Abbildung 33 und im Anhang **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**)

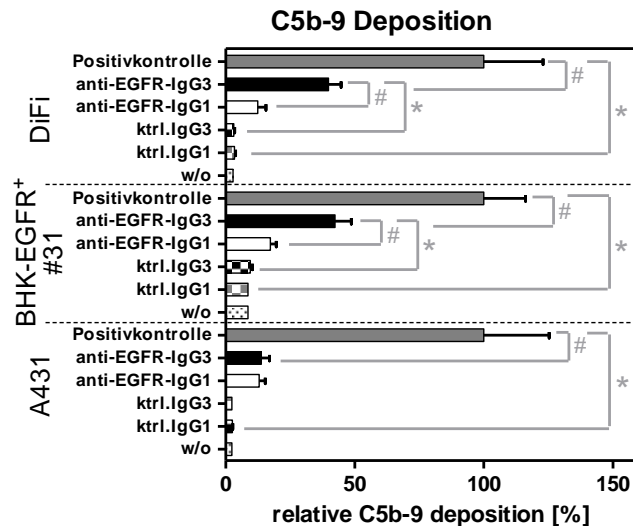


Abbildung 33. EGFR-gerichtete Antikörper vermittelte C5b-9 Anlagerung an A43 DiFi und BHK-EGFR+ #31. Insertion von C5b-9 (MAC) wurde in Gegenwart von human Serum (25 % v/v) und EGFR-gerichteten Antikörpern Kontrollantikörpern (66,66 nM anti-EGFR-IgG1,-IgG3 und Kontrollantikörper / 33,33 nM jeder EGFR-gerichtete mAk der Positivkontrolle) mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert. Relative Deposition wurde anhand der durch die Positivkontrolle generierten RFI berechnet, indem die RFI der Positivkontrolle gleich 100 % gesetzt wurde. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehlern von drei unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) zwischen Kontrollantikörpern und spezifischen Antikörpern sind mit *, zwischen anti-EGFR-IgGg1 und anti-EGFR-IgG3 oder der Positivkontrolle mit # gekennzeichnet.

4.2.4 Freisetzung von Anaphylatoxinen

Um die funktionellen Konsequenzen der Komplementanlagerung an Zielzellen zu untersuchen, wurden im Folgenden Anaphylatoxin-Freisetzungsexperimente durchgeführt, deren Ergebnisse in Tabelle 17 zusammengefasst sind. Die Anaphylatoxin-Freisetzung wurde mittels kalibrierter Durchflusszytometrie bestimmt. Unter Verwendung von DiFi und BHK-EGFR⁺ #5 als Zielzellen wurde eine signifikante Freisetzung von C4a, C3a und C5a durch anti-EGFR-IgG3 erzielt. Die Positivkontrolle induzierte eine signifikante Freisetzung von C4a und C5a während einer Komplementaktivierung gegenüber DiFi und BHK-EGFR⁺ #5, wobei nur gegenüber DiFi Zellen auch eine signifikante Freisetzung von C3a durch die Positivkontrolle generiert wurde. Unter Verwendung von A431 induzierte die Positivkontrolle interessanterweise eine signifikante C4a, C3a und C5a Freisetzung, wobei der anti-EGFR-IgG3 nur eine signifikante C4a Freisetzung induzierte. Dies lässt darauf schließen, dass anti-EGFR-IgG3 gegenüber A431 Zellen zwar effizient die Spaltung von C4 zu C4a und C4b induzierte, aber nicht die Entstehung der C3-Konvertase und C5-Konvertasen katalysierte. Für den anti-EGFR-IgG1 konnte eine signifikante C3a Freisetzung für DiFi und A431 Zellen, aber nicht für BHK-EGFR⁺ #5 Zellen gezeigt werden. Eine signifikante C4a und C5a

Ergebnisse

Freisetzung induziert durch den anti-EGFR-IgG1 konnte für keine der drei verwendeten Zellenlinien beobachtet werden.

Tabelle 17. Anaphylatoxin-Freisetzung durch EGFR-gerichtete Antikörper

Anaphylatoxin Freisetzung [ng/ml]	w/o			anti-EGFR-IgG1			anti-EGFR-IgG3			Positivkontrolle		
	C4a	C3a	C5a	C4a	C3a	C5a	C4a	C3a	C5a	C4a	C3a	C5a
DiFi	255	519	18,6	291	584	25	431	602	40,2	447	592	46
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	61,4	17,2	3,7	43,2	21,6	3,4	51,2	17,2	9,4	23	4,9	5,8
BHK-EGFR⁺ #5	322	474	8,1	323	471	8,4	424	555	15,1	358	509	14,1
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	55	49,8	1,6	50,8	50	1,7	50	51,2	3,2	57	44	2,1
A431	326	384	9,7	379	452	11	393	410	8,8	446	473	15,8
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	55,8	53,6	2,1	45,4	67	2,2	39,8	43,6	1,9	49,4	43,2	3,1

Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehlern von drei unabhängigen Experimenten.

* = Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) zwischen Medium und spezifischen Antikörpern,

4.3 Einfluss von membranständigen Komplementregulatoren auf die anti-EGFR-IgG3 induzierte Komplementaktivierung

4.3.1 siRNA-induzierte Herunterregulierung von *mCRP*

Um zu untersuchen, ob die Expression der *mCRPs* einen Einfluss auf die anti-EGFR-IgG3 induzierte CDC hatte, wurden die *mCRP* Moleküle (CD46, CD55 und CD59) auf den einzelnen Zelllinien (A431, A1207, DiFi und BHK-EGFR⁺ #5) mittels kalibrierter Durchflusszytometrie quantifiziert (Tabelle 18). Die BHK-EGFR⁺ #5 Zelllinie exprimierte keinen der drei humanen Komplementregulatoren, da es sich bei dieser Zelllinie vom Ursprung her um eine Hamster-Zelllinie handelte. Für die übrigen drei untersuchten Zelllinien A431, A1207 und DiFi konnten signifikante Unterschiede in der *mCRP* Expression gezeigt werden. Die höchste CD46 Expression wurde für DiFi Zellen, gefolgt von A431 und A1207 gezeigt. Im Gegensatz zu CD46 konnte die höchste CD55 und CD59 Expression für A431, gefolgt von A1207 und DiFi ermittelt werden.

Tabelle 18. *mCRP* Expressionslevel auf den untersuchten Zelllinien

Antigen [SABS]	A431	DiFi	A1207	BHK-EGFR ⁺ #5
CD46	172.980 ±11.364	347.168 ±19.933	98.058 ±6.247	-
CD55	88.868 ±5.708	39.773 ±4.306	60.039 ±16.538	-
CD59	427.654 ±64.832	124.735 ±18.012	240.939 ±24.359	-

SABS= spezifische Antigen Bindungsstellen / Zelle

Daraufhin wurde untersucht, ob die relativen zellspezifischen anti-EGFR-IgG3 induzierten Lyseraten mit den *mCRP*-Expressionsleveln korrelierten (Abbildung 34). Die Korrelationsanalysen erfolgten bei saturierenden anti-EGFR-IgG3 Konzentrationen (13,3 nM). Die Lyserate gegenüber BHK-EGFR⁺ #5 wurde für die Berechnung gleich 100 % gesetzt, so dass die Lyseraten gegenüber den restlichen Zelllinien anhand der BHK-EGFR⁺ #5 Lyserate eingeordnet werden konnten. Es konnte keine Korrelation zwischen maximaler Lyse und CD46-Expression festgestellt werden, wobei für CD55 und CD59 eine negative Korrelation zwischen *mCRP*-Expression und anti-EGFR-IgG3 induzierter Lyse ermittelt werden konnte (R = -0,9; p = 0.06 für CD55 / R = -0,9; p = 0.06 für CD59)

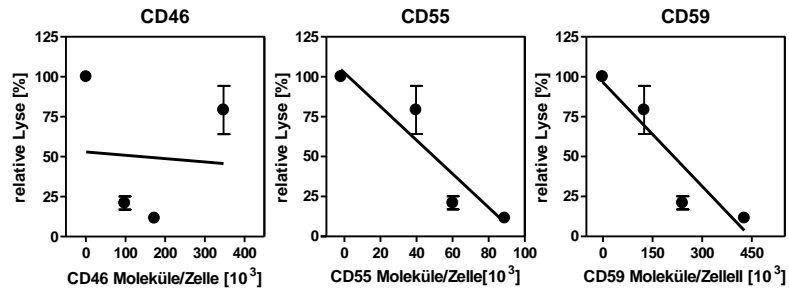


Abbildung 34. Korrelation von CD46, CD55 oder CD59 Expression und relativer Lyse bei Komplementaktivierung durch anti-EGFR-IgG3.

Auf Grundlage der Korrelationsergebnisse von anti-EGFR-IgG3 induzierter *CDC* und *mCRP* Expression sollte im Folgenden der Einfluss der *mCRPs* auf A431 Zellen im Detail analysiert werden. Hierfür wurden die *mCRPs* (CD46, CD55 und CD59) mittels siRNA auf A431 herunterreguliert. Im ersten Schritt wurde eine Testreihe mit je drei verschiedenen *mCRP*-gerichteten siRNAs für die einzelnen Regulatoren angesetzt (Abbildung 35). Die hierbei verwendete siRNA Konzentration lag bei 25 nM. A431 Zellen wurden mittels Lipofektion mit den *mCRP*-gerichteten siRNAs (einzeln oder zusammen) oder mit einer Kontroll-siRNA transfiziert und für 48 Stunden in Zellmedium inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Expression von CD46, CD55 und CD59 mittels direkter Durchflusszytometrie analysiert. Anhand der Expression der *mCRPs* unter Verwendung der Kontroll-siRNA konnte die Effizienz der siRNA-induzierten Herunterregulierung von CD46, CD55 und CD59 bestimmt werden. Hierbei wurde die ermittelte Fluoreszenzintensität unter Verwendung der Kontroll-siRNA auf 100% gesetzt, sodass die Fluoreszenzintensitäten für die *mCRP* nach Behandlung mit spezifischer siRNA eingeordnet werden konnten. Die höchste Effizienz der Herunterregulierung für CD46 induzierte die siRNA #2. Für CD55 war dies siRNA #1 und für CD59 siRNA #2.

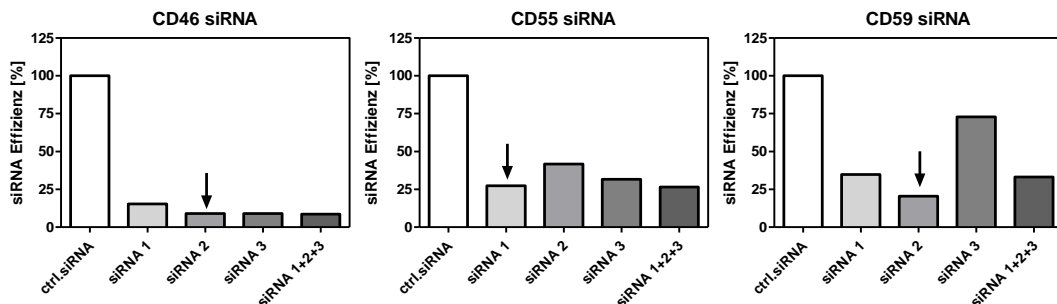


Abbildung 35. Effizienz der siRNA-induzierten *mCRP*-Herunterregulierung. A431 Zellen wurden in einer 6-Well-Platte über Nacht ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die siRNA-Transfektion (25 nM) mittels Lipofektion gefolgt von einer Inkubation für 48 Stunden. Die siRNA Effizienz wurde mittels direkter Immunfluoreszenz unter Verwendung von Fluorochrom-konjugierter *mCRP*-spezifischer mAks (CD46-Pacific blue, CD55-PE, CD59-FITC) ermittelt

Ergebnisse

Im zweiten Schritt wurde eine Testreihe mit je vier verschiedenen Konzentrationen (12,5 nM; 25 nM; 50 nM; 100 nM) der ausgewählten siRNAs für die einzelnen Regulatoren angesetzt. Wiederum wurden A431 Zellen mittels Lipofektion mit den *mCRP*-gerichteten siRNAs oder mit einer Kontroll-siRNA transfiziert und für einen Zeitraum von 24 bis 72 Stunden inkubiert (Abbildung 36). Nach der Inkubationszeit wurde die Effizienz der siRNA-vermittelten Herunterregulierung von CD46, CD55 und CD59 mittels direkter Durchflusszytometrie analysiert. Hierbei wurde die Fluoreszenzintensität unter Verwendung der Kontroll-siRNA wiederum auf 100 % gesetzt und die Fluoreszenzintensitäten für die *mCRP* nach Behandlung mit spezifischer siRNA eingeordnet. Die höchste Effizienz der Herunterregulierung für CD46 ergab die siRNA #2 bei 50 nM für 48 Stunden, für CD55 und CD59 war die siRNA bei 50 nM für 72 Stunden am effektivsten. Aufgrund dieser Daten wurden für alle weiteren siRNA-Experimente eine Konzentration der siRNAs von 50 nM und eine Inkubationszeit von 72 Stunden gewählt.

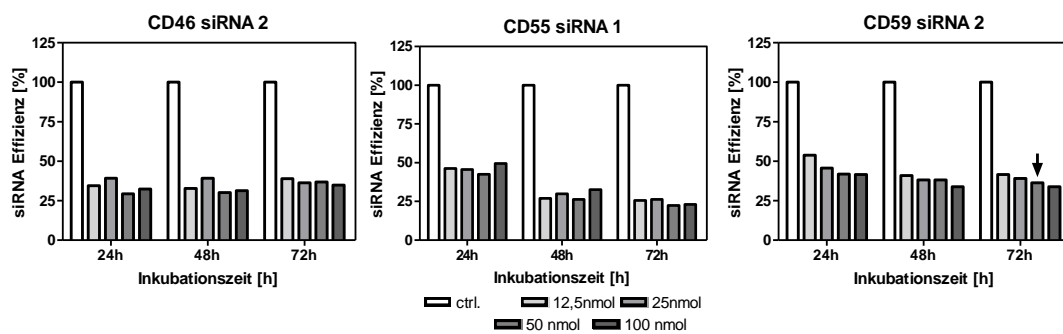


Abbildung 36. Analyse der optimalen siRNA-Konzentration und der Dauer der Transfektion für die Herunterregulierung der *mCRPs*. A431 Zellen wurden in einer 6-Well-Platte über Nacht ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die siRNA-Transfektion (12,5 – 100 nM) mittels Lipofektion gefolgt von einer Inkubation von 24 bis 72 Stunden. Die Effizienz der siRNA-vermittelten Herunterregulierung der *mCRPs* wurde mittels direkter Immunfluoreszenz unter Verwendung von Fluorochrom-konjugierten *mCRP*-spezifischen mAbs (CD46-Pacific blue, CD55-PE, CD59-FITC) ermittelt. Der Pfeil hebt die in den folgenden Experimenten genutzten siRNA-Konzentrationen und Transfektionsbedingungen hervor.

Auf Grundlage der Testreihen wurden die siRNAs und Transfektionsbedingungen für die folgenden Experimente ausgewählt, unter welchen die höchste *mCRP*-Herunterregulierung-Effizienz erzielt worden war. Für die CD46-spezifische siRNA #2 wurde eine maximale CD46-Herunterregulierung um ~73 %, für die CD55-spezifische siRNA #1 eine maximale CD55-Herunterregulierung um ~67 % und für die CD59-spezifische siRNA #2 eine maximale CD59-Herunterregulierung um ~67 % erzielt. Für die Kombination aller drei (CD46 + CD55 + CD59) siRNAs wurde ähnlich der einzelnen siRNAs eine signifikante Herunterregulierung der *mCRP* erzielt. Hierbei lag die Effizienz der CD46-spezifischen siRNA #2 bei ~ 77%, die

Ergebnisse

der CD55-spezifischen siRNA #2 bei ~ 55% und die der CD59-spezifischen siRNA #2 bei ~ 58%. Exemplarische Histogramme der siRNA-vermittelten Herunterregulierung sind in Abbildung 37 und Abbildung 38 dargestellt.

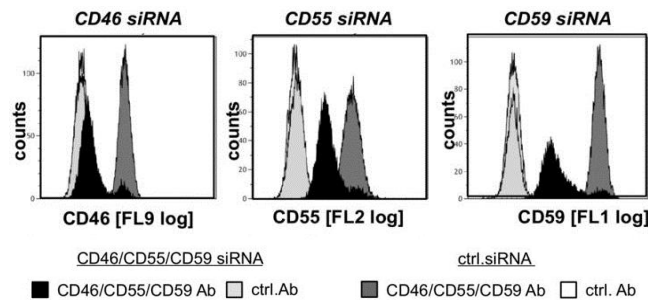


Abbildung 37. Exemplarische Histogramme der einzelnen siRNA vermittelten Herunterregulierung der *mCRPs*. A431 Zellen wurden in einer 6-Well-Platte über Nacht ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die siRNA-Transfektion (50nM) mittels Lipofektion gefolgt von einer Inkubation für 72 Stunden. Die Effizienz der siRNA-vermittelten Herunterregulierung der *mCRPs* wurde mittels direkter Immunfluoreszenz unter Verwendung von Fluorochrom-konjugierten *mCRP*-spezifischen mAks (CD46-Pacific Blue, CD55-PE, CD59-FITC) ermittelt.

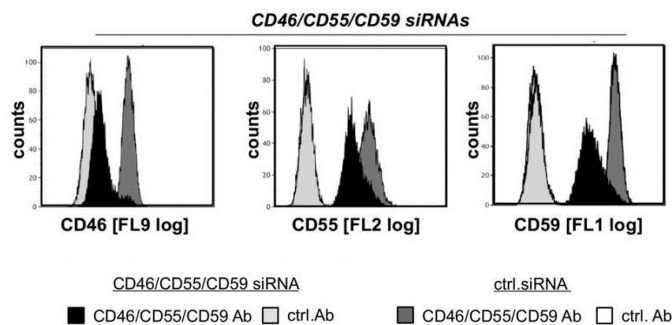


Abbildung 38. Exemplarische Histogramme der siRNA Kombination von CD46, CD55 und CD59 vermittelten Herunterregulierung der *mCRPs*. A431 Zellen wurden in einer 6-Well-Platte über Nacht ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die siRNA-Transfektion (pro siRNA je 16,7 nM) mittels Lipofektion gefolgt von einer Inkubation für 72 Stunden. Die Effizienz der siRNA-vermittelten Herunterregulierung der *mCRPs* wurde mittels direkter Immunfluoreszenz unter Verwendung von Fluorochrom-konjugierter *mCRP*-spezifischer mAks (CD46-Pacific Blue, CD55-PE, CD59-FITC) ermittelt.

Im Folgenden wurden *CDC* Experimente mit anti-EGFR-IgG1, anti-EGFR-IgG3 oder Kontrollantikörpern und humanem Serum als Komplementressource gegenüber KontrollsiRNA- oder *mCRP*-spezifischer siRNA transfizierten A431 durchgeführt. Eine siRNA-induzierte CD46-Herunterregulierung hatte keinerlei Einfluss auf die anti-EGFR-IgG1- wie auch auf die anti-EGFR-IgG3 induzierte *CDC* (Abbildung 39).

Ergebnisse

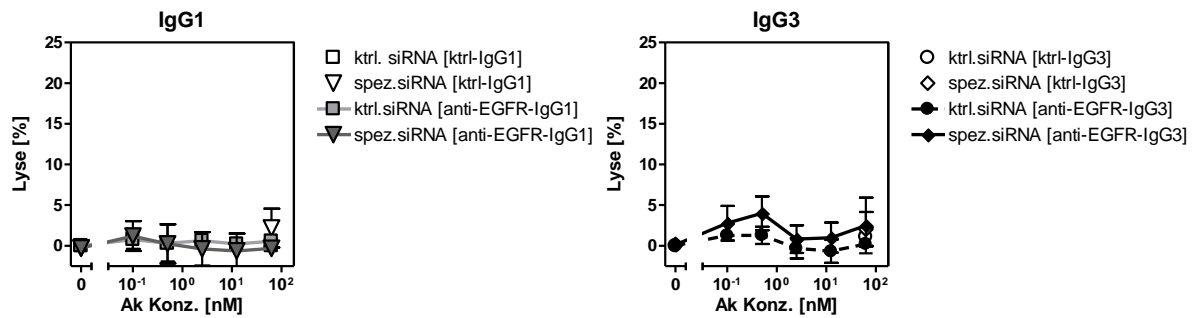


Abbildung 39. CD46-Herunterregulierung und EGFR-gerichtete Antikörper induzierte CDC gegenüber siRNA-transfizierten A431. A431 Zellen wurden in einer 10 cm-Platte über Nacht ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die siRNA-Transfektion (50 nM) mittels Lipofektion gefolgt von einer Inkubation für 72 Stunden. CDC-Induktion durch anti-EGFR-IgG1 oder anti-EGFR-IgG3 gegenüber siRNA-transfizierten A431 Tumorzellen wurde mittels ⁵¹Chrom-Freisetzungstest bestimmt. Als Quelle des Komplementsystems diente humanes Serum (25 % v/v). Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehlern von drei unabhängigen Experimenten.

Im Gegensatz zur siRNA-induzierten CD46-Herunterregulierung verbesserte eine Herunterregulierung von CD55 auf A431 signifikant die anti-EGFR-IgG3 induzierte CDC ($10,4 \pm 4,4$ % maximale Lyse). Interessanterweise hatte eine CD55-Herunterregulierung keinen Einfluss auf anti-EGFR-IgG1 induzierte CDC. Die Kontrollantikörper induzierten weder gegenüber Kontroll-siRNA-transfizierten noch gegenüber CD55-siRNA-transfizierten A431 eine komplementabhängige Zytotoxizität (Abbildung 40).

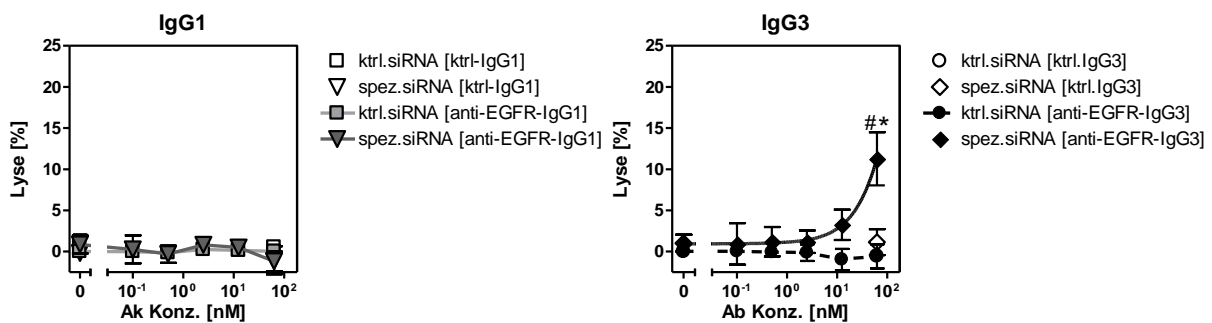


Abbildung 40. CD55-Herunterregulierung und EGFR-gerichtete Antikörper induzierte CDC gegenüber siRNA-transfizierten A431. A431 Zellen wurden, wie in Abb. 39 beschrieben, transfiziert. CDC Induktion durch anti-EGFR-IgG1 oder anti-EGFR-IgG3 gegenüber siRNA-transfizierten A431 Tumorzellen wurde mittels ⁵¹Chrom-Freisetzungstest bestimmt. Als Quelle des Komplementsystems diente humanes Serum (25 % v/v). Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehlern von drei unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) zwischen irrelevanten Kontrollantikörpern und spezifischen Antikörpern sind mit *, zwischen Kontroll-siRNA und spezifischer siRNA mit # gekennzeichnet.

Des Weiteren verbesserte auch eine CD59-Herunterregulierung auf A431 signifikant die anti-EGFR-IgG3 induzierte CDC ($14,0 \pm 4,3$ % maximale Lyse). Wiederum hatte die

Ergebnisse

Herunterregulierung von CD59 keinen Einfluss auf anti-EGFR-IgG1 induzierte *CDC*. Die Kontrollantikörper induzierten weder gegenüber Kontroll-siRNA-transfizierten noch gegenüber CD59-siRNA-transfizierten A431 *CDC* (Abbildung 41).

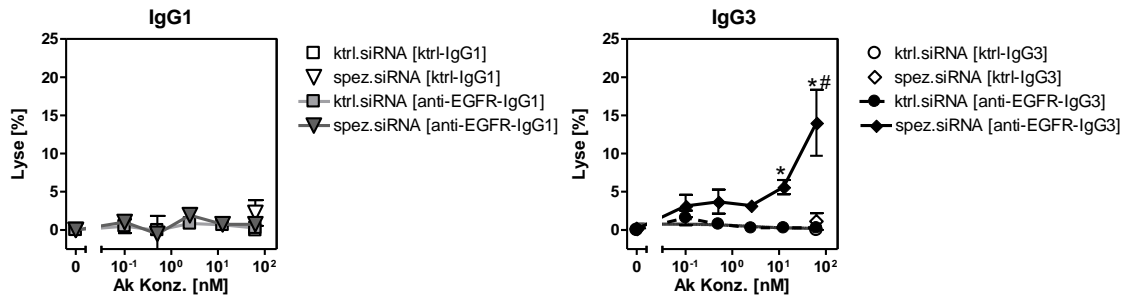


Abbildung 41. CD59-Herunterregulierung und EGFR-gerichtete Antikörper induzierte *CDC* gegenüber siRNA-transfizierten A431. A431 Zellen wurden, wie in Abb. 39 beschrieben, transfiziert. *CDC* Induktion durch anti-EGFR-IgG1 oder anti-EGFR-IgG3 gegenüber siRNA-transfizierten A431 Tumorzellen wurde mittels ⁵¹Chrom-Freisetzungstest bestimmt. Als Quelle des Komplementsystems diente humanes Serum (25 % v/v). Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehlern von drei unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) zwischen Kontrollantikörpern und spezifischen Antikörpern sind mit *, zwischen Kontroll-siRNA und spezifischer siRNA mit # gekennzeichnet.

Eine weitere Verbesserung der anti-EGFR-IgG3 induzierten *CDC* konnte durch eine Kombination aller drei *mCRP*-spezifischer siRNAs ($36,5 \pm 2,1$ % maximale Lyse) erzielt werden. Wiederum hatte die Herunterregulierung aller drei *mCRPs* keinen Einfluss auf die anti-EGFR-IgG1-induzierte *CDC*. Die Kontrollantikörper induzierten wiederum weder gegenüber Kontroll-siRNA-transfizierten noch gegenüber *mCRP*- siRNA-transfizierten A431 Zellen *CDC* (Abbildung 42).

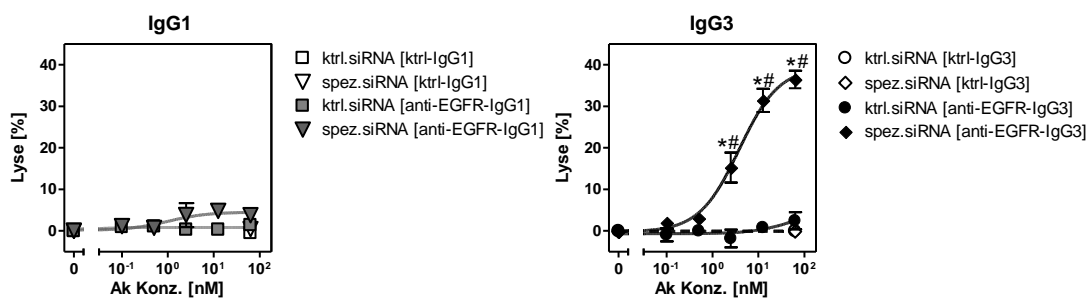


Abbildung 42. *mCRP*-Herunterregulierung und EGFR-gerichtete Antikörper induzierte *CDC* gegenüber siRNA-transfizierten A431. A431 Zellen wurden, wie in Abb. 39 beschrieben, transfiziert. 50 nM für Kontroll-siRNA und 16,6 nM für die einzelnen spezifischen siRNA). *CDC* Induktion durch anti-EGFR-IgG1 oder anti-EGFR-IgG3 gegenüber siRNA-transfizierten A431 Tumorzellen wurde in Gegenwart von humanem Serum (25 % v/v) mittels ⁵¹Chrom-Freisetzungstest bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) zwischen Kontrollantikörpern und spezifischen Antikörpern sind mit *, zwischen Kontroll-siRNA und spezifischer siRNA mit # gekennzeichnet.

Ergebnisse

Auf Grund der Tatsache, dass CD55 deutlich früher als CD59 und somit funktionell in die Komplementkaskade eingreift, sollte im Folgenden der Einfluss von CD55 auf eine anti-EGFR-IgG3 induzierte Komplementaktivierung im Detail untersucht werden.

4.3.2 Überexpression von CD55 und CD59

Zur weiteren Analyse des Einflusses von CD55 auf die anti-EGFR-IgG3 induzierte Komplementaktivierung, wurden BHK-EGFR⁺ #5 Zellen, welche endogen kein humanes CD55 exprimieren, transient mit einem CD55-kodierenden Vektor transfiziert. Die Transfektion bewirkte eine starke Überexpression von CD55 (Kontrollvektor RFI = $1,2 \pm 0,2$ gegenüber CD55-Vektor RFI = $380,8 \pm 39,7$) auf der Zelloberfläche von BHK-EGFR⁺ #5 Zellen (Abbildung 43).

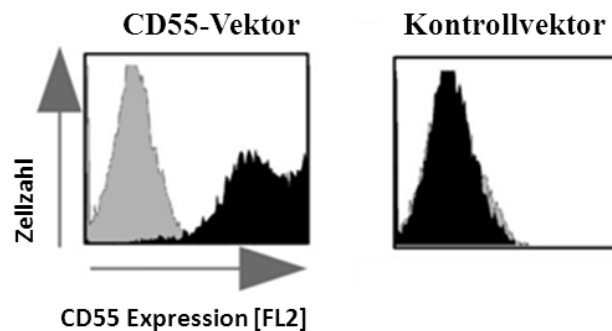


Abbildung 43. Transiente CD55-Überexpression auf BHK-EGFR⁺ #5 Zellen. BHK-EGFR⁺ #5 Zellen wurden in einer 10 cm-Platte über Nacht ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion (12 µg für die jeweiligen Vektoren) mittels Lipofektion gefolgt von einer Inkubation für 48 Stunden. Die Effizienz der CD55-Überexpression wurde mittels direkter Immunfluoreszenz unter Verwendung von Fluorochrom-konjugierten *mCRP*-spezifischen mAk (CD55-PE) ermittelt.

Im nächsten Abschnitt dienten entweder Kontrollvektor oder CD55-Vektor transfizierte BHK-EGFR⁺ #5 Zellen als Zielzellen in CDC Experimenten mit anti-EGFR-IgG3 oder Kontrollantikörpern. Zuerst wurden konzentrationsabhängige Versuche mit anti-EGFR-IgG3 oder Kontrollantikörpern und humanem Serum als Komplementquelle gegenüber Kontrollvektor oder CD55-Vektor transfizierten BHK-EGFR⁺ #5 Zellen durchgeführt. Eine CD55-Überexpression hatte eine signifikante Abnahme ($\approx 60\%$) der konzentrationsabhängigen anti-EGFR-IgG3 induzierten Lyse zur Folge. Der Kontrollantikörper induzierte CDC weder gegenüber Kontrollvektor noch gegenüber CD55-Vektor transfizierte BHK-EGFR⁺ #5 (Abbildung 44/A).

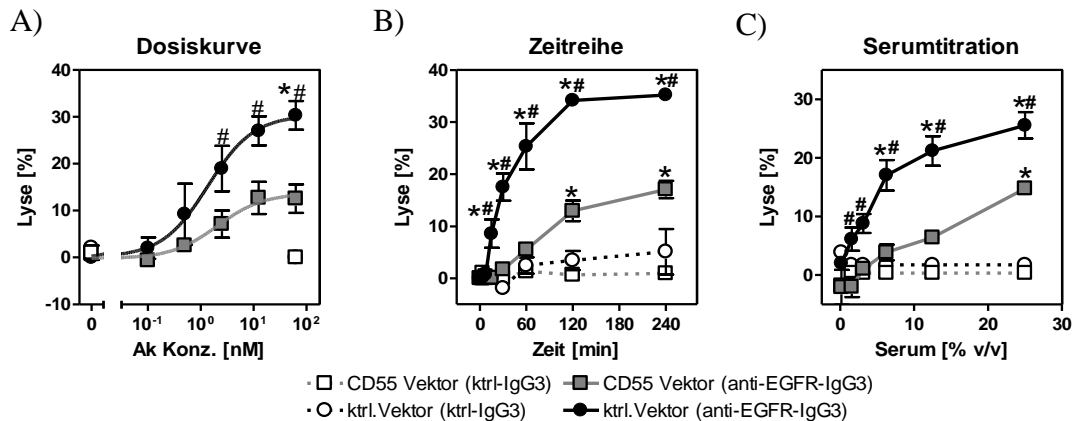


Abbildung 44. EGFR-gerichtete Antikörper induzierte CDC gegenüber CD55-transfizierten BHK-EGFR⁺ #5 Zellen. BHK-EGFR⁺ #5 Zellen wurden in einer 10 cm-Platte über Nacht ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion mittels Lipofektion gefolgt von einer Inkubation für 48 Stunden. CDC-Induktion durch den anti-EGFR-IgG3 oder Kontrollantikörper gegenüber CD55-Vektor oder Kontrollvektor transfizierten BHK-EGFR⁺ #5 Zellen wurde mittels ⁵¹Chrom-Freisetzungstest bestimmt. Als Quelle des Komplementsystems diente humanes Serum. Es wurde sowohl eine (A) Antikörper Dosiskurve (0-66,67 nM, Inkubation für drei Stunden bei 37 °C), (B) eine Zeitreihe (mAk Konz. bei 13,3 nM / 0 bis 240 min bei 37 °C) wie auch (C) eine Serumtitration (mAk Konz. bei 66,67 nM / 0 % - 25 % humanes Serum v/v, Inkubation für drei Stunden bei 37 °C) durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehlern von drei unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) zwischen Kontrollantikörpern und spezifischen Antikörpern sind mit *, zwischen Kontrollvektor und CD55-Vektor transfizierten Zellen mit # gekennzeichnet.

Um zu überprüfen, ob die Expression von CD55 auf der Zelloberfläche einen Einfluss auf die Art der anti-EGFR-IgG3 induzierten Komplementaktivierung (klassisch oder alternativ) hat, wurde im Folgenden die Kinetik der Komplementaktivierung mittels CDC-Experimenten auf Kontrollvektor oder CD55-Vektor transfizierten BHK-EGFR⁺ #5 Zellen ermittelt (Abbildung 44/B). Da die Kinetik der klassischen deutlich schneller als die der alternativen Komplementaktivierung ist, konnte unter Zuhilfenahme einer Zeitreihe zwischen diesen Arten der Komplementaktivierung unterschieden werden (Jones et al. 1979). Im Folgenden wurden daher CDC-Experimente mit saturierenden Konzentrationen von anti-EGFR-IgG3 und Kontrollantikörpern (13.3 nM) zu verschiedenen Zeitpunkten (0 min bis 240 min) gegenüber Kontrollvektor oder CD55-Vektor transfizierten BHK-EGFR⁺ #5 Zellen durchgeführt. Interessanterweise konnte eine signifikant langsamere Kinetik der Komplementaktivierung durch den anti-EGFR-IgG3 gegenüber CD55-Vektor transfizierten Zellen ($EC_{50} = 85,00 \pm 1,95$ min) im Vergleich mit Kontrollvektor transfizierten Zellen ($EC_{50} = 32,41 \pm 2,71$ min) beobachtet werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der anti-EGFR-IgG3 gegenüber CD55-positiven Zellen hauptsächlich alternative Komplementaktivierung induziert. Um den Einfluss der alternativen Komplementaktivierung

Ergebnisse

gegenüber CD55-positiven Zellen weiter zu untersuchen, wurden *CDC*-Experimente mit saturierenden Konzentrationen von anti-EGFR-IgG3 und Kontrollantikörpern (66,67 nM) unter Verwendung unterschiedlicher Serumkonzentrationen (0–25 % v/v) gegenüber Kontrollvektor oder CD55-Vektor transfizierten BHK-EGFR⁺ #5 Zellen durchgeführt. Bei geringen Serumkonzentrationen zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen Kontrollvektor oder CD55-Vektor transfizierten BHK-EGFR⁺ #5 in der anti-EGFR-IgG3 induzierten Komplementaktivierung (Abbildung 44/C). Diese Ergebnisse deuten wiederum daraufhin, dass der anti-EGFR-IgG3 in Gegenwart von CD55 hauptsächlich den alternativen Weg der Komplementaktivierung induziert, da eine alternative Komplementaktivierung im Vergleich mit einer klassischen Aktivierung eine deutlich höhere Serumkonzentration benötigt (Tofte et al., 1980). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von CD55 signifikant die maximale *CDC* von anti-EGFR-IgG3 verringert. Interessanterweise konnte eine solche signifikante Abnahme der maximalen Lyse für die in dieser Arbeit verwendete Positivkontrolle, bestehend aus zwei nicht epitopüberlappenden EGFR-gerichteten IgG1 Antikörpern, nicht nachgewiesen werden (Abbildung 45)

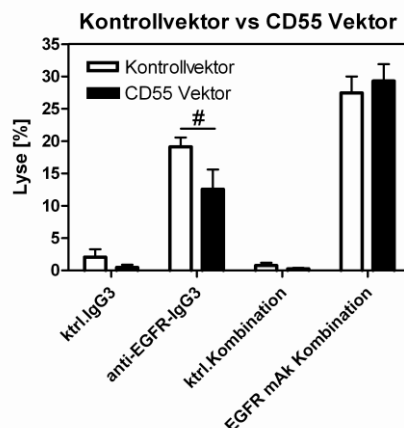


Abbildung 45. EGFR-gerichtete Antikörper induzierte *CDC* von CD55-transfizierten BHK-EGFR⁺ #5 Zellen: Vergleich von anti-EGFR-IgG3 mit der Positivkontrolle BHK-EGFR⁺ #5 wurden, wie in Abb.44 beschrieben, transient mit einem Kontrollvektor oder CD55-Vektor transfiziert. *CDC*-Induktion wurde mittels ⁵¹Chrom-Freisetzungstest bestimmt. Die Antikörperkonzentration lag für anti-EGFR-IgG3 und den ktrl-IgG3 bei 66,67 nM, für die Positivkontrolle und die Kontrollkombination bei 33,33 nM pro eingesetzten Antikörper. Der *CDC*-Ansatz beinhaltete 25 % humanes Serum (v/v) als Quelle des Komplementsystems und wurde für drei Stunden bei 37 °C inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehlern von drei unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) zwischen Kontrollvektor und CD55-Vektor sind mit gekennzeichnet.

Um die alternative Komplementaktivierung durch den anti-EGFR-IgG3 auf CD55-positiven Zellen im direkteren Maße zu untersuchen, wurden *CDC* Experimente mit anti-EGFR-IgG3 gegenüber Kontrollvektor oder CD55-Vektor transfizierten BHK-EGFR⁺ #5 Zellen in An-

Ergebnisse

und Abwesenheit des alternativen Komplement Inhibitors *CR1g-Fc* durchgeführt. Die Inhibition des alternativen Weges hatte gegenüber Kontrollvektor transfizierten Zellen keinerlei Einfluss auf die anti-EGFR-IgG3 induzierte komplementvermittelte Lyse. Interessanterweise konnte jedoch eine starke Inhibition ($\approx 50\%$) der anti-EGFR-IgG3 induzierten komplementvermittelten Lyse von CD55-Vektor transfizierten BHK-EGFR⁺ #5 Zellen in Anwesenheit von *CR1g-Fc* beobachtet werden (Abbildung 46).

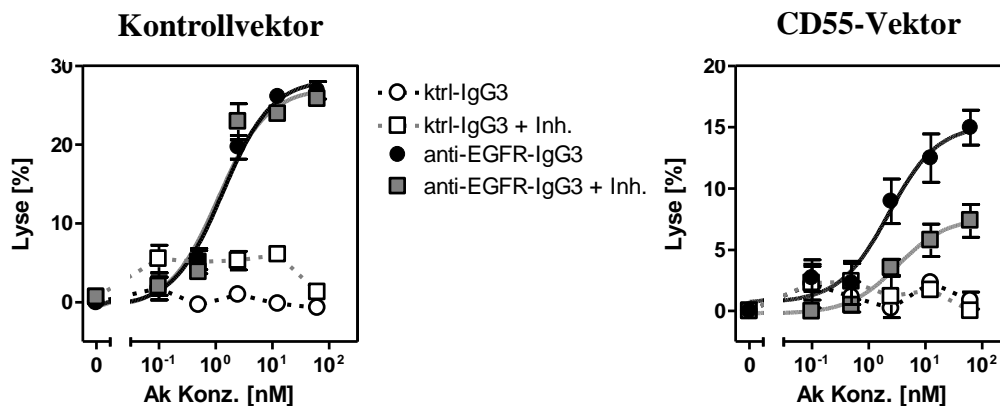


Abbildung 46. Inhibition alternativer Komplement-Aktivierung mittels *CR1g-Fc*. BHK-EGFR⁺ #5 wurden, wie in Abb.44 beschrieben, transient mit einem Kontrollvektor oder CD55-Vektor transfiziert. CDC-Induktion durch den anti-EGFR-IgG3 oder Kontrollantikörpern gegenüber CD55-Vektor oder Kontrollvektor transfizierten BHK-EGFR⁺ #5 Zellen wurde mittels ⁵¹Chrom-Freisetzungstest in An- und Abwesenheit von *CR1g-Fc* (10 µg/ml) bestimmt. Als Quelle des Komplementsystems diente humanes Serum (25 % v/v). Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehlern von drei unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) zwischen Kontrollantikörpern und spezifischen Antikörpern sind mit *. Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) in An- und Abwesenheit des alternativen Komplementinhibitors *CR1g-Fc* sind mit # gekennzeichnet.

Des Weiteren sollte überprüft werden, ob die Aktivierung der anti-EGFR-IgG3-induzierten Komplementkaskade gegenüber CD55-positiven Zellen C1q-abhängig ist. Es wurden daraufhin CDC-Experimente mit anti-EGFR-IgG3 gegenüber Kontrollvektor oder CD55-Vektor transfizierten BHK-EGFR⁺ #5 Zellen in An- und Abwesenheit von C1q durchgeführt. Sowohl gegenüber Kontrollvektor wie auch CD55-Vektor transfizierten BHK-EGFR⁺ #5 Zellen war die anti-EGFR-IgG3 induzierten Komplementkaskade C1q abhängig (Abbildung 47). Die Kontrollantikörper induzierten keine CDC weder in Anwesenheit noch in Abwesenheit von C1q.

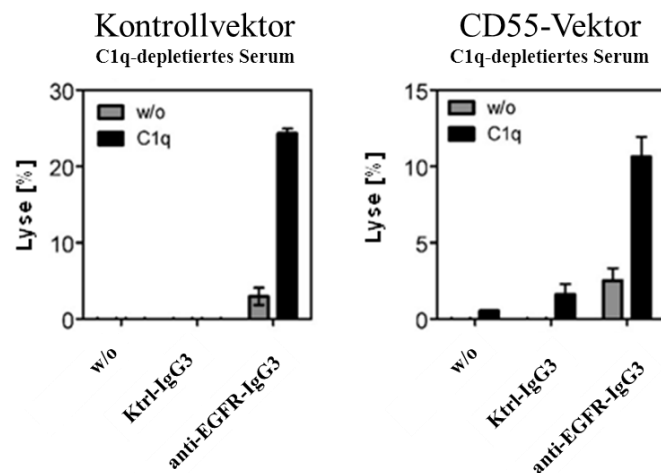


Abbildung 47. C1q-Abhängigkeit der EGFR-gerichteten Antikörper induzierten CDC gegenüber CD55-transfizierten BHK-EGFR⁺ #5 Zellen BHK-EGFR⁺ #5 wurden, wie in Abb.44 beschrieben, transient mit einem Kontrollvektor oder CD55-Vektor transfiziert. CDC Induktion durch die Antikörper (66,67nM) wurde mittels ⁵¹Chrom-Freisetzungstest in An- und Abwesenheit von C1q (70 µg/ml) bestimmt. Als Quelle des Komplementsystems diente C1q-depletiertes humanes Serum (25% v/v). Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehlern der in diesem Experiment ermittelten Triplikate.

Abschließend wurde durchflusszytometrisch untersucht, ob in Anwesenheit von CD55 der anti-EGFR-IgG3 eine erhöhte Faktor Bb Deposition induziert. Hierfür wurden wiederum Kontrollvektor oder CD55-Vektor transfizierte BHK-EGFR⁺ #5 Zellen verwendet. In Anwesenheit von CD55 induzierte der anti-EGFR-IgG3 eine signifikant erhöhte Faktor Bb Anlagerung als in Abwesenheit (Abbildung 48).

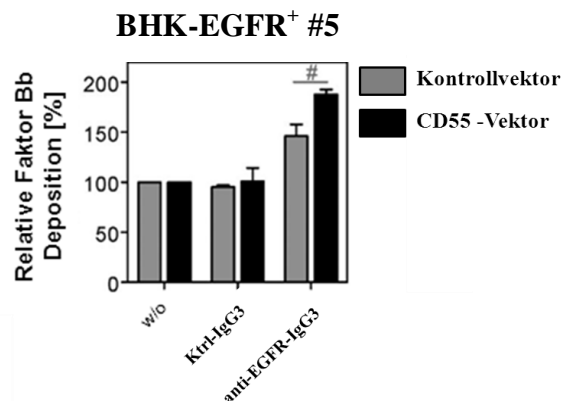


Abbildung 48. Faktor Bb Anlagerung durch anti-EGFR-IgG3 auf CD55-negativen und CD55-positiven BHK-EGFR⁺ #5 Zellen. BHK-EGFR⁺ #5 wurden, wie in Abb.44 beschrieben, transient mit einem Kontrollvektor oder CD55-Vektor transfiziert. Faktor Bb Deposition wurde in Gegenwart von humanem Serum (25% v/v) und 66,67 nM der Antikörper mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert. Relative Deposition wurde an Hand der in Abwesenheit von mAKs generierten RFI berechnet, indem die RFI gleich 100 % gesetzt wurde. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehlern von drei unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) zwischen Kontrollvektor und CD55-Vektor transfizierten Zellen sind mit # gekennzeichnet.

4.3.3 Endogen CD55 exprimierende Zelllinien und Induktion des alternativen Wegs

Im letzten Abschnitt sollte überprüft werden, ob anti-EGFR-IgG3 im gleichen Maße den alternativen Weg der Komplementkaskade gegenüber Zellen mit endogener CD55 Expression (DiFi Zellen) aktiviert, wie gegenüber den transienten CD55-transfizierten BHK-EGFR⁺ #5 Zellen.

Daher wurden CDC-Experimente mit anti-EGFR-IgG3 gegenüber DiFi Zellen wiederum in An- und Abwesenheit des AP Inhibitors *CRIG-Fc* durchgeführt. Die Inhibition des AP hatte eine starke Inhibition ($\approx 80\%$) der anti-EGFR-IgG3 induzierten CDC zur Folge. (Abbildung 49/A). Zusätzlich wurde überprüft, ob die anti-EGFR-IgG3 induzierte CDC Faktor B abhängig, also abhängig vom alternativen Weg, war. Wiederum wurden CDC-Experimente mit anti-EGFR-IgG3 gegenüber DiFi Zellen in An- und Abwesenheit von Faktor B durchgeführt. In Anwesenheit von Faktor B induzierte der anti-EGFR-IgG3 eine maximale Lyse von 17%. Die Abwesenheit von Faktor B hatte eine Abnahme der anti-EGFR-IgG3 induzierten CDC wiederum um $\approx 80\%$ zur Folge. (Abbildung 49/B).

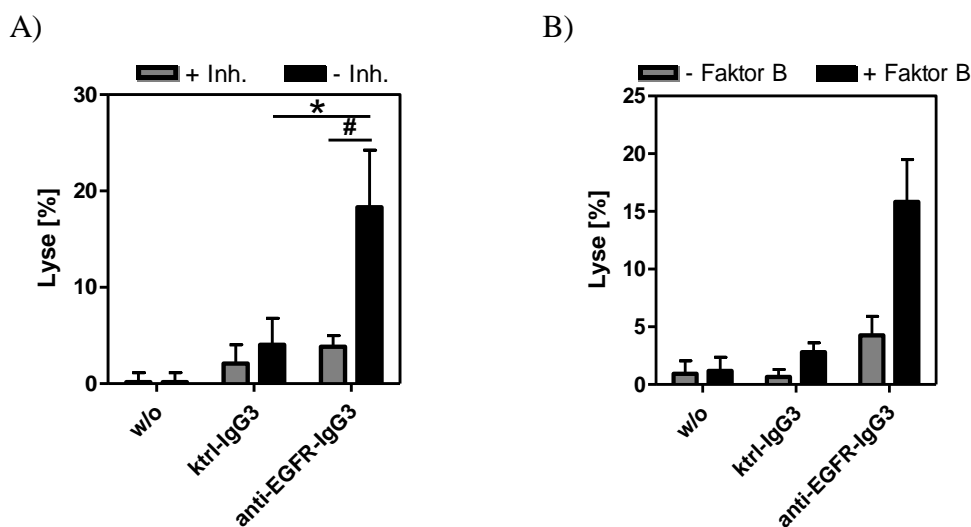


Abbildung 49. Aktivierung des alternativen Wegs gegenüber endogen CD55 exprimierenden DiFi Zellen. CDC Induktion durch den anti-EGFR-IgG3 oder Kontrollantikörpern gegenüber DiFi Zellen wurde mittels ⁵¹Chrom-Freisetzungstest in An- und Abwesenheit (A) von *CRIG-Fc* (10 μ g/ml) oder (B) Faktor B (200 μ g/ml). bestimmt. Als Quelle des Komplementsystems diente entweder (A) normales humanes Serum (25 % v/v) oder Faktor B depletiertes humanes Serum (25 % v/v). Dargestellt sind für (A) Mittelwerte mit Standardfehlern von drei unabhängigen Experimenten und für (B) Mittelwerte mit Standardfehler der in diesem Experiment ermittelten Triplikate. Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) zwischen -Inhibitor und +Inhibitor sind mit # gekennzeichnet.

5 Diskussion

Das Komplementsystem leistet einen wichtigen Beitrag bei der effektiven Abwehr pathogener Erreger und bei der Eliminierung maligner Zellen durch das Immunsystem (Ricklin et al., 2010). Des Weiteren wird angenommen, dass das Komplementsystem zur klinischen Effizienz von Tumor-gerichteten Antikörpern, wie Rituximab, beiträgt (Glennie et al., 2007). Im Gegensatz zu den hämato-onkologisch verwendeten monoklonalen Antikörpern induzieren EGFR-gerichtete Antikörper, wie Cetuximab, keine Komplementaktivierung gegenüber soliden Tumoren *in vitro* (Dechant et al., 2008). Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher eine IgG3-Variante des therapeutischen Antikörpers Cetuximab generiert, um potentielle strukturelle Vorteile von IgG3-Antikörpern in der Komplementaktivierung auszunutzen. Des Weiteren sollte untersucht werden, inwiefern die IgG3-Variante von Cetuximab die Komplementkaskade initiiert und welchen Einfluss anti-EGFR-IgG3 auf die Ausbildung der Konvertasen des Komplementsystems hat. Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war die Analyse des Einflusses von zellulären Faktoren, wie den *mCRPs*, auf die IgG3 induzierte Komplementaktivierung.

5.1 EGFR-gerichtete Antikörper und Komplementaktivierung

Trotz identischer Fab-vermittelter Effekte konnten große Unterschiede in Bezug auf die Komplementaktivierung zwischen EGFR-gerichteten IgG1- und IgG3-Antikörpern beobachtet werden. Im Gegensatz zu der IgG1-Variante konnte innerhalb dieser Arbeit gezeigt werden, dass die IgG3-Variante von Cetuximab eine Aktivierung des Komplementsystems gegenüber EGFR-positiven Zellen induzierte.

5.1.1 EGFR-gerichtete Antikörper vom IgG1-Isotyp induzieren keine Komplementaktivierung gegenüber EGFR-positiven Zellen

Der im Rahmen dieser Arbeit generierte anti-EGFR-IgG1 induzierte weder gegenüber EGFR-transfizierten BHK-EGFR⁺ Zellen noch gegenüber den humanen Tumorzelllinien A431, A1207 oder DiFi CDC. Das Phänomen, dass EGFR-gerichtete IgG1 Antikörper keine Komplementaktivierung gegenüber soliden Tumorzelllinien induzieren, wurde in früheren Studien über EGFR-gerichtete Antikörper und Komplementaktivierung beschrieben (Dechant et al., 2008). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine Kombination von nicht-epitopüberlappenden EGFR-gerichteten IgG1 Antikörpern komplementabhängig solide Tumorzellen *in vitro* lysieren konnte (Dechant et al., 2008). Eine effektive Komplementinduktion durch IgG Antikörper bedarf der Fixierung von C1q durch mindestens

zwei Fc-Teile, genauer durch zwei CH2-Domänen, welche in enger räumlicher Nähe zueinander stehen müssen (Duncan and Winter, 1988; Painter, 1984). Im Falle des EGFR lässt sich daher annehmen, dass die strukturellen Begebenheiten des Zielantigens, wie der Abstand oder die Orientierung des Epitops von Cetuximab zur Membran, die effektive Zusammenführung zweier Fc-Teile von IgG1-Antikörpern negativ beeinflusst. Unter dieser Prämisse kann angenommen, dass Cetuximab in Bezug auf die Komplementaktivierung ein ungünstiges Epitop im EGFR bindet. Im Falle einer EGFR-mAk-Kombination können die beiden unterschiedlichen EGFR-gerichteten mAk in einer 2:1 Stöchiometrie an den EGFR binden. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Fc-Teile der zwei unterschiedlichen anti-EGFR-IgG1 Antikörper nach Antigenbindung effizienter in räumliche Nähe gelangen (Derer et al., 2014a).

5.1.2 EGFR-gerichtete Antikörper vom IgG3-Isotyp induzieren eine Komplementaktivierung gegenüber EGFR-positiven Zellen

Der EGFR-gerichteten Antikörper des IgG3-Isotyps, welche im Rahmen dieser Arbeit erstellt wurde, konnte das Komplementsystem gegenüber EGFR-positiven Zellen aktivieren und diese zum Teil komplementabhängig lysieren. Schon in früheren Studien zur IgG3-vermittelten Komplementaktivierung konnte gezeigt werden, dass IgG3 unter den IgG-Isotypen am effektivsten das Komplementsystem, genauer C1q, rekrutieren (Brüggemann et al., 1987) und komplementabhängig Zellen lysieren konnte (Garred et al., 1989b; Michaelsen et al., 1991). Die Vorteile in der IgG3-induzierten Komplementaktivierung werden den strukturellen Unterschieden zwischen IgG1- und IgG3-Antikörpern zugeschrieben (Brekke et al., 1995). Die strukturellen Unterschiede in der *hinge* Region und in den Disulfidbrücken zwischen schwerer und leichter Kette bedingen, dass Antikörper vom IgG3-Isotyp deutlich flexibler sind als Antikörper vom IgG1-Isotyp (Roux et al., 1997; Roux et al. 1998). Diese erhöhte Flexibilität ermöglicht es IgG3-Antikörpern auch in strukturell ungünstigen Situationen, wie einer zu geringen Antigenkonzentration, C1q effizient zu fixieren und das Komplementsystem zu aktivieren. (Garred et al., 1989b). Die höhere Flexibilität der IgG3-Variante von Cetuximab im Vergleich zum Antikörper des IgG1-Isotyps scheint daher, die ungünstige Bindung des Epitops im EGFR in Bezug auf die Komplementaktivierung kompensieren zu können.

5.2 Ausbildung der C3- und C5-Konvertasen durch anti-EGFR-IgG3

anti-EGFR-IgG3 induzierte gegenüber CD55-negativen und CD55 niedrig exprimierenden Zellen CDC. Interessanterweise konnte keine anti-EGFR-IgG3 vermittelte CDC gegenüber CD55 hoch exprimierenden Zellen, wie A431, beobachtet werden. Daher wurde im Rahmen

Diskussion

dieser Arbeit die Initiation der Komplementkaskade durch anti-EGFR-IgG3 mittels Depositions- und Anaphylatoxin-Freisetzungsexperimenten im Detail untersucht. Anti-EGFR-IgG3 induzierte, trotz der unterschiedlichen komplementvermittelten Zytotoxizitäten, gegenüber allen untersuchten Zelllinien eine stärkere C1q Anlagerung als die IgG1-Variante und als eine Positivkontrolle, bestehend aus zwei nicht-epitopüberlappenden EGFR-gerichteten IgG1 Antikörpern.

Diese Diskrepanz, zwischen starker IgG3-abhängiger C1q-Anlagerung aber geringer komplementinduzierter Lyse, wurde auch in früheren Studien schon beobachtet (Brüggemann et al., 1987). Hierbei zeigte sich, dass Antikörper vom IgG3-Isotyp, trotz effizienter C1q-Anlagerung, eine deutlich eingeschränkte Deposition von C4b wie auch C3b induzierten. An Hand dieser Ergebnisse wird deutlich, dass Antikörper vom IgG3-Isotyp äußerst ineffizient die Ausbildung klassischer Konvertasen katalysieren (Bindon et al., 1988; Bindon et al., 1990). Im CD20-Hintergrund konnte zudem die Gruppe um Natsume et al. zeigen, dass ein CD20-gerichteter IgG3-Antikörper trotz hoher C1q Deposition nur geringe Level von C4b auf der Zielzellmembran deponierte (Natsume et al., 2008). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen der IgG3-induzierten Komplementaktivierung zeigten zwei weitere Studien in einem ELISA-Testsystem entweder eine ähnliche (Michaelsen et al., 1990) oder sogar eine stärkere (Mollnes et al., 1995) C4b-Bindung durch Antikörper des IgG3-Isotyps im Vergleich zu Antikörpern des IgG1-Isotyps.

Anti-EGFR-IgG3, welcher im Rahmen dieser Arbeit generiert wurde, zeigte ähnlich den Ergebnissen von Brüggemann et al. und Bindon et al. eine äußerst effektive C1q Rekrutierung. Im Vergleich mit der Positivkontrolle induzierte anti-EGFR-IgG3 jedoch eine signifikant geringere C4b-Anlagerung. Die niedrige C4b-Deposition durch den EGFR-gerichteten IgG3-Antikörper war dabei unabhängig von zellulären Faktoren, wie zum Beispiel den EGFR-Expressionsleveln oder den *mCRP*-Expressionsleveln.

Interessanterweise induzierte anti-EGFR-IgG3 jedoch gegenüber allen untersuchten Zelllinien eine Freisetzung des Anaphylatoxins C4a. C4a fungierte im Rahmen dieser Arbeit als Marker für die Aktivierung von C4 zu C4a und C4b. Dem entsprechend bewirkte anti-EGFR-IgG3 zwar eine signifikante Aktivierung von C4 zu C4b, scheiterte aber an einer effizienten Anlagerung von C4b. Des Weiteren konnte, im Besonderen für die resistente Zelllinie A431, gezeigt werden, dass der EGFR-gerichtete IgG3-Antikörper nur geringe Mengen der Anaphylatoxine C3a und C5a freisetzte. Dies legt den Schluss nahe, dass der EGFR-gerichtete IgG3-Antikörper äußerst ineffizient die Ausbildung der C3- und C5-Konvertasen katalysierte.

5.3 Der Einfluss der putativen C4b Bindestelle im IgG3-Molekül auf klassische Komplementaktivierung

Während anti-EGFR-IgG3 zwar effektiver C1q rekrutierte, konnte innerhalb dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Positivkontrolle zweier IgG1 Antikörper im Vergleich mit anti-EGFR-IgG3 deutlich effektiver C4b deponierte. Ähnliche Ergebnisse erbrachten die Studien von Brüggemann et al. und Bindon et al. Sie konnten zeigen, dass der IgG1-Isotyp im Vergleich zum IgG3-Isotyp zwar eine geringere Fähigkeit zur Rekrutierung von C1q besaß, jedoch deutlich effizienter Zielzellen komplementabhängig lysieren konnte. Diese Beobachtung wurde im Folgenden durch die deutlich effizientere Aktivierung von C4 und C3 durch den IgG1 Antikörper erklärt. Aufgrund der unterschiedlichen Eigenschaften in der C4b-Aktivierung und -Anlagerung kann davon ausgegangen werden, dass sich Antikörper vom IgG1- und IgG3-Isotyp in ihrer Art, C4b zu deponieren, unterscheiden (Brüggemann et al., 1987; Bindon et al., 1988; Bindon et al., 1990).

Frühere Studien von Alcolea et al. und Campbell et al. konnten zeigen, dass aktiviertes C4b nicht den C1-Komplex, sondern direkt die Antigen-Antikörper Immunkomplexe bindet. Zudem wurde beobachtet, dass C4b innerhalb der schweren Ketten der Antikörper bindet, so dass dort die putative C4b-Bindestelle lokalisiert sein könnte. (Alcolea et al., 1987; Campbell et al., 1980). Die Bindung von C4b an die schwere Kette der Antikörper erfolgt wahrscheinlich über die Thioester-Domäne im C4b-Molekül, welche nach Aktivierung freigesetzt wird (Dodds et al., 1996). Mit Hilfe dieser Gruppe ist es jedoch auch möglich, dass aktiviertes C4b mit membranständigen Hydroxyl-Gruppen oder Amino-Gruppen von Glykoproteinen interagiert (Dodds et al., 1996). Hieraus ergibt sich die zukünftig interessante Frage, ob für eine effiziente CDC die C4b Bindung an den Antikörper oder die Zellmembran entscheidend ist. Hierbei könnte es durchaus Isotyp-spezifische Unterschiede geben.

Des Weiteren waren Studien mit IgG-haltigen Immunkomplexen (C3b₂-IgG-Komplexe) in der fluiden Phase ausschlaggebend für Untersuchungen zu einer potentiellen Bindungsstelle für C3b im IgG-Molekül (Lutz and Jelezarova, 2006). Eine potentielle C3b-Bindestelle würde auch eine potentielle C4b-Bindestelle darstellen, da sowohl C4b als auch C3b über die internen Thioester-Domänen ähnliche kovalente Bindungen eingehen können (Abbildung 50).

Diskussion

```
C3 959 QGTPVAQ-MTEDAVDAERLKHLIVTPSGCGEONMIGMTPTVIAVHYLDETEQWE 1013
C4 981 ASDPLDTLGSEGalSPGGVASLLRLPRGCGEOTMIYLAPTLAASRYLDKTEQWS 1035
. *: *: *:. : *: * *****.** :*: * :*:*****.
```

Abbildung 50. Sequenz-Ausschnitt aus C3 und C4. In rot ist die Aminosäuresequenz des internen Thioesters dargestellt. In grün sind die Aminosäuren, welche den internen Thioester ausbilden, gekennzeichnet. Die Sequenzdaten entstammender Uniprot Datenbank. C3-Link: <http://www.uniprot.org/uniprot/P01024>, C4-Link: <http://www.uniprot.org/uniprot/P0C0L5>

Die Lokalisation dieser Bindungsstellen wird kontrovers diskutiert, wobei grundsätzlich davon ausgegangen wird, dass sie sich in der CH1-Domäne von IgG-Antikörpern befindet. Pangburn et al. konnten zeigen, dass C3b mittels der internen Thioester-Domäne an das Threonin in Position 135 (Threonin 135) von Antikörpern des IgG1-Isotyps bindet und über die Hydroxol-Gruppen eine kovalente Bindung ausbildet. Hierfür generierten sie Peptide, welche ihren Sequenzursprung in der CH1-Domäne des IgG1 hatten (Sahu and Pangburn, 1994). Im Gegensatz dazu beschrieb die Gruppe um Vidarte et al. Serin in Position 132 (Serin 132) als die C3b-Bindestelle im IgG1-Molekül. In dieser Studie waren, anstatt der von Pangburn et al. genutzten CH1-Peptide, ganze Antikörper des IgG1-Isotyps zum Einsatz gekommen (Vidarte et al., 2001). Interessanter Weise handelt es sich sowohl beim Threonin 135 als auch beim Serin 132 um hoch konservierte Aminosäuren innerhalb der IgG-Isotypen. Sowohl die CH1-Domäne des IgG1, IgG2, IgG3 als auch des IgG4 beinhaltet diese Aminosäuren. Ein wichtiger Punkt ist jedoch, dass sich die Aminosäureumgebung vom Serin 132 zwischen IgG1 und IgG3 unterscheidet (Abbildung 51). Beim IgG1 liegt N-terminal benachbart ein weiteres Serin in Position 131 vor. Im Gegensatz hierzu befindet sich beim IgG3 in Position 131 ein Cystein, welches essentiell an der Ausbildung der Disulfidbrücken zwischen leichter und schwerer Kette beteiligt ist (Liu and May, 2012). Auch die C-terminale Umgebung des Serins 132 unterscheidet sich zwischen Antikörpern des IgG1- und IgG3-Isotyps. Während sich in Position 133 beim IgG1-Isotyp ein Lysin befindet, liegt im IgG3-Isotyp an dieser Stelle ein Arginin. Diese strukturellen Unterschiede könnten sich auch auf die C3b- bzw. C4b-Bindung durch Antikörper des IgG1- und IgG3-Isotyps auswirken.

```
IgG1 ASTKGPSVFPLAPSRSKTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS 60
IgG3 ASTKGPSVFPLAPCSRSISGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS 60
*****. *:*****
```

Abbildung 51. Sequenz-Ausschnitt aus der CH1-Domäne von IgG1 und IgG3. In rot sind die potentiellen Aminosäuren gezeigt, welche an einer C4b und C3b Bindung beteiligt sein könnten

Der Bereich um das Threonin 135 hingegen ist hochkonserviert und unterscheidet sich nicht zwischen IgG1 und IgG3. Die strukturellen Begebenheiten, welche durch die unterschiedlichen Disulfidbrücken bedingt sind, könnten jedoch auch einen Einfluss auf die Orientierung der Hydroxyl-Gruppe des Threonins 135 haben.

Eine weitere Möglichkeit das unterschiedliche Verhalten in der C4b-Bindung zwischen IgG1- und IgG3-Antikörpern zu erklären, beruht auf der Tatsache, dass das aktivierte C4b Molekül nur eine Serumhalbwertszeit von 25 bis 30 ps besitzt (Sim et al., 1981; Tack, 1983). Diese kurze Halbwertszeit wird bedingt durch die schnelle Hydrolyse des Thioesters im C4b-Molekül. Des Weiteren bewirkt die kurze Halbwertszeit, dass aktivierte C4b-Moleküle nur eine durchschnittliche Distanz von 6 nm diffundieren können, bevor es zur Hydrolyse kommt. Dieser Abstand ist kürzer als die *hinge* Region eines IgG3-Antikörpers, welche eine durchschnittliche Länge von 9 nm aufweist (Pumphrey, 1986)). Daher kann angenommen werden, dass IgG3-Antikörper zwar C4 zu C4b effizient aktivieren, aber das aktivierte Molekül nicht seine Akzeptorstelle, zum Beispiel die Zellmembran, erreicht.

Die Daten zur IgG3-induzierten C4b Anlagerung, welche im Rahmen dieser Arbeit generiert wurden, lassen eine genaue Beurteilung des molekularen Mechanismus nicht zu, so dass in zukünftigen Studien die Art der C4b-Anlagerung durch Antikörper des IgG3-Isotyps detaillierter untersucht werden muss.

5.4 Der Einfluss von membranständigen Komplementregulatoren auf die IgG3-induzierte Komplementaktivierung

5.4.1 CD55 als Inhibitor der anti-EGFR-IgG3 induzierten Komplementaktivierung

Im Verlauf dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die anti-EGFR-IgG3 induzierte Komplementaktivierung und *CDC* negativ mit der Expression der *mCRPs* CD55 und CD59 auf den Zielzellen korreliert. Im Gegensatz zu einem anti-EGFR-IgG1 verbesserte eine siRNA-vermittelte Herunterregulierung sowohl von CD59 als auch von CD55 signifikant die Komplementaktivierung und die *CDC* durch anti-EGFR-IgG3.

Die siRNA-induzierte Herunterregulierung von CD46 hatte hingegen keine Auswirkung auf die anti-EGFR-IgG3 vermittelte Komplementaktivierung, obwohl CD46 C4b und insbesondere C3b binden und unter Einfluss von Faktor I degradieren kann. CD46 spielt demnach hauptsächlich eine Rolle in der Regulation des *AP* (Seya and Atkinson, 1989). Die im Rahmen dieser Arbeit generierten Daten lassen jedoch eine genaue Beurteilung des mechanistischen Einflusses von CD46 auf die Komplementaktivierung durch anti-EGFR-IgG3 nicht zu.

Diskussion

Die alleinige siRNA-induzierte Verminderung der CD59-Expression bewirkte, dass anti-EGFR-IgG3 *CDC* gegenüber A431 Zellen induzieren konnte. CD59 interagiert jedoch ausschließlich mit Bestandteilen des terminalen Komplementkomplexes (Meri et al., 1990) und kann demnach keinen Einfluss auf die Initiation und die Art der Komplementaktivierung durch den EGFR-gerichteten IgG3-Antikörper ausüben.

CD55 als Komplementregulator induziert jedoch den Zerfall klassischer wie auch alternativer C3- und C5-Konvertasen. Die Affinität von CD55 ist jedoch deutlich höher gegenüber den klassischen - als gegenüber den alternativen Konvertasen (Pangburn, 1986; Harris et al., 2007). Da anti-EGFR-IgG3 sehr ineffizient C4b anlagerte, werden klassische Konvertasen äußerst ineffektiv ausgebildet. Somit kann CD55 einen sehr starken inhibitorischen Einfluss auf die anti-EGFR-IgG3 induzierte Komplementaktivierung ausüben. Die alleinige siRNA-vermittelte Herunterregulierung von CD55 war ausreichend, um ehemals resistente Zellen (A431) komplementabhängig durch anti-EGFR-IgG3 zu lysieren. Dies gelang trotz der weiterhin inhibitorischen Funktionen von CD46 und CD59.

Insbesondere die Studien von Olafsen et al. unterstützen die These, dass CD55 unter den *mCRPs* den größten Einfluss auf die IgG3-Antikörper induzierte Komplementaktivierung hat. Olafsen et al. konnten zeigen, dass IgG3-induzierte Komplementaktivierung gegenüber Tumorzellen durch eine simultane Blockade von CD46, CD55 und CD59 gesteigert werden konnte. Die alleinige Blockade von CD59 bewirkte eine signifikant geringere Induktion der komplementvermittelten Lyse durch IgG3. Dies deutet wiederum auf einen Beitrag von CD55 zur Regulation der IgG3-induzierten Komplementaktivierung hin (Olafsen et al., 1999).

5.4.2 Die Expression von CD55 induziert eine C1q-abhängige alternative Komplementaktivierung durch EGFR-gerichtete Antikörper des IgG3-Isotyps

Zur weiteren Untersuchung des Einflusses von CD55 auf die anti-EGFR-IgG3 induzierte Komplementaktivierung wurde im Rahmen dieser Arbeit CD55 auf BHK-EGFR⁺ #5 Zellen transient überexprimiert. Eine CD55-Überexpression war mit einer deutlich geringeren *CDC* durch den EGFR-gerichteten IgG3-Antikörper verbunden. Interessanterweise bedingte die Expression von CD55 nicht nur eine Abnahme der *CDC*, sondern hatte einen direkten Einfluss auf die Art der anti-EGFR-IgG3 induzierten Komplementaktivierung.

An Hand der Datenlage wird deutlich, dass eine CD55 Expression eine Induktion des alternativen Komplementweges durch anti-EGFR-IgG3 „forciert“. Dies erklärt auch die höhere Deposition der Faktoren C3b und Faktor Bb durch anti-EGFR-IgG3 auf Zellen, welche CD55 exprimieren. Interessanterweise war die alternative Komplementaktivierung

Diskussion

durch den EGFR-gerichteten Antikörper des IgG3-Isotyps jedoch weiterhin abhängig von dem Initiator-molekül des klassischen Weges, C1q.

Diese Ergebnisse führten im Rahmen dieser Arbeit zu folgendem Modell der anti-EGFR-IgG3 induzierten Komplementaktivierung (Abbildung 52): Unter Bedingungen, bei welchen keine CD55 Expression vorliegt, induziert der EGFR-gerichtete IgG3-Antikörper eine klassische Komplementaktivierung. Bei CD55 Expression vermittelte der EGFR-gerichtete IgG3-Antikörper hauptsächlich eine alternative Komplementaktivierung, die durch den klassischen Weg induziert wurde. Dieser Mechanismus wird durch zwei Ursachen bedingt. (1) CD55 inhibiert effizienter klassische als alternative Konvertasen und (2) anti-EGFR-IgG3 bildet sehr ineffizient klassische Konvertasen aus. Daher wird während einer anti-EGFR-IgG3-induzierten Komplementaktivierung der CP nahezu vollständig, der AP jedoch nur unvollständig durch CD55 inhibiert (Abbildung 52).

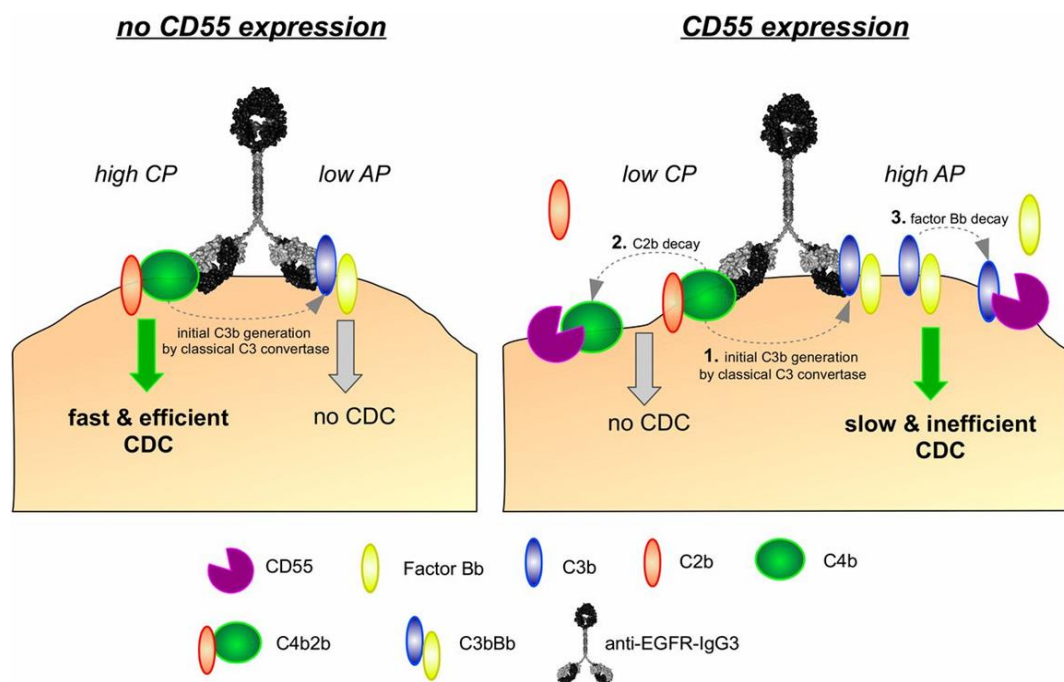


Abbildung 52. Schematische Darstellung des Einflusses von CD55 auf die anti-EGFR-IgG3 induzierte Komplementaktivierung. Dargestellt ist die Komplementaktivierung durch anti-EGFR-IgG3 Antikörper in An- und Abwesenheit von CD55. Die Abbildung entstammt Rösner et al., 2014.

Giuntini et al generierten einem IgG3-Antikörper, welcher ein Antigen auf Meningokokken-Stämmen erkannte. In diesen Studien induzierten die Antikörper vom IgG3-Isotyp hauptsächlich den AP, falls die Antigenexpression sehr gering ausfiel. Die Autoren dieser Publikation gingen davon aus, dass die IgG3-abhängige Induktion des AP nicht direkt, sondern indirekt über eine initiale Induktion des CP herbeigeführt wurde. Demnach war die in

diesen Studien beobachtete Aktivierung des *AP* durch Antikörper des IgG3-Isotyps bedingt durch eine alternative Amplifikation der initialen klassischen Komplementaktivierung (Giuntini et al., 2012). Dem entsprechend handelt es sich hierbei um einen ähnlichen Mechanismus der Komplementaktivierung, welcher im Rahmen dieser Arbeit für den EGFR-gerichteten Antikörper des IgG3-Isotyps vorgeschlagen wurde.

Interessanterweise konnten frühere Studien zur Komplementaktivierung durch Antikörper des IgG3-Isotyps zeigen, dass IgG3-Antikörper klassische Aktivatoren des *CP* sind. Alternative Komplementaktivierung durch Antikörper des IgG3-Isotyps konnte in diesen Studien nicht nachgewiesen werden (Lucisano Valim and Lachmann, 1991).

5.5 Die Stellung des Komplementsystems in der Immuntherapie

Der Beitrag des Komplementsystems zum klinischen Erfolg von mAk in der Tumormimmuntherapie wird kontrovers diskutiert. Für die Aktivität des Komplementsystems in der antikörperbasierten Tumorthherapie sprechen, dass nach Gabe der CD20-gerichteten monoklonalen Antikörper Rituximab oder Ofatumumab ein rascher Verbrauch des Komplementsystems im Blut von Patienten beobachtet wurde (Kennedy et al., 2004; Beurskens et al., 2012). Eine mögliche Komplementaktivierung zum Beispiel durch Rituximab konnte jedoch auch mit möglichen akuten Nebenwirkungen einhergehen (van der Kolk et al., 2001). Eine weitere Beobachtung, welche den Einfluss des Komplementsystems unterstreicht, war, dass die Gabe von frischem Plasma den Therapieerfolg von Rituximab steigern konnte (Klepfish et al., 2007).

Des Weiteren wurden Studien durchgeführt, um den Einfluss eines C1qA(276A/G) Polymorphismus zu untersuchen. Individuen, welche das A Allel dieses Polymorphismus trugen, wiesen charakteristisch geringere Mengen an C1q im Plasma auf (Racila et al., 2003). Sowohl beim follikulären Lymphom wie auch beim diffus großzelligen B-Zell-Lymphom zeigten Träger des A Allels ein besseres Ansprechen auf die Rituximab Therapie. Daher gingen die Autoren dieser Studien davon aus, dass das Komplementsystem keinen direkten oder sogar einen nachteiligen Einfluss auf die Rituximab Therapie hatte (Racila et al., 2008; Jin et al., 2012). Es gibt jedoch weitere Möglichkeiten, den positiven Einfluss des A Allels des C1qA (276A/G) Polymorphismus während der Rituximab Therapie zu erklären. Zum Beispiel kann bei Trägern des A Allels dieses Allel einen Wechsel von CDC zu ADCC herbeiführen, indem es zu einer Konkurrenz von C1q mit den Fc-Rezeptoren um die Antikörper kommt (Derer et al., 2014a). Neben einer potentiellen Funktion bei der Eliminierung maligner Zellen zeigen andere Erkenntnisse, dass das Komplementsystem auch

einen positiven Einfluss auf das Tumorwachstum haben kann, insbesondere wenn es nicht durch mAk aktiviert wird. Das Komplementsystem kann zum Beispiel über Anaphylatoxine *MDSC* in die Tumorumgebung rekrutieren und so einen entzündungsfördernden Status induzieren (Markiewski et al., 2008). Daher könnte es von besonderer Bedeutung sein, das Komplementsystem zur Abwehr maligner Zellen und Tumoren durch monoklonale Antikörper zu nutzen.

5.6 Das therapeutische Potential von IgG3-Antikörpern

5.6.1 Produktivität, Stabilität und Halbwertszeit

Für die therapeutische Entwicklung mAk ist es von Bedeutung, Produktionsbedingungen zu etablieren, welche es ermöglichen, proteinbasierte Immuntherapeutika reproduzierbar, GMP-konform und kostengünstig zu produzieren. Hierfür wurden von der pharmazeutischen Industrie Prozessplattformen generiert, welche diese Bedingungen erfüllen. Ein wichtiger Faktor während der Produktion klinisch zu verwendender mAk ist die chromatographische Aufreinigung von Antikörpern mittels Protein A-Säulen (Shukla and Thömmes, 2010). Protein A ist ein Zellwandprotein aus dem Genus *Staphylococcae* und kann Immunglobuline der IgG-Familie in der CH3-Domäne binden. Interessanterweise zeigen Antikörper vom IgG1-, IgG2- und IgG4-Isotyp eine Protein A Bindung, IgG3-Antikörper jedoch nicht (Kronvall and Williams, 1969).

In den Studien von Natsume et al. zu einem chimären Molekül aus IgG1/IgG3-Antikörpern konnte gezeigt werden, dass der alleinige Austausch des Arginin an Position 435 zu Histidin in einem IgG3-Molekül ausreichend ist, um die Protein A Bindung wieder herzustellen (Natsume et al., 2008). In späteren Untersuchungen zu IgG3 wurde dann deutlich, dass das Histidin in Position 435 auch unter natürlichen Bedingungen in bestimmten Allotypen von IgG3-Antikörpern vorkommt. Das Vorhandensein des Histidin in Position 435 ermöglicht es IgG3-Antikörpern zudem, an den neonatalen Fc-Rezeptor (FcRn) zu binden (Stapleton et al., 2011). Die FcRn Bindung von Antikörper bedingt, dass sich die Serumhalbwertszeit dieser Antikörper verbessert, indem ein zellulärer Recycling-Mechanismus induziert wird. Im Gegensatz zu den übrigen IgG-Isotypen zeigen IgG3-Moleküle häufig eine deutlich kürzere Halbwertszeit bedingt durch eine fehlende FcRn-Bindung. Bei IgG3-Molekülen, welche an Position 435 ein Histidin tragen, steigert dies die Halbwertszeit auf das Niveau der übrigen IgG-Isotypen (Stapleton et al., 2011; Vidarsson et al., 2014). Die im Rahmen dieser Arbeit generierten Antikörper des IgG3-Isotyps besaßen an Position 435 ein Histidin, sodass

Diskussion

potentielle Probleme in der Protein A sowie FcRn-Bindung nicht bestehen sollten (Vidarsson et al., 2014).

Das therapeutische Potential eines monoklonalen Antikörpers wird nicht nur durch die möglichen Effektormechanismen bedingt. Andere Faktoren, wie Stabilität und Halbwertszeit im Serum, spielen eine wichtige Rolle. Antikörper vom IgG3-Isotyp zeichnen sich durch eine besonders lange *hinge* Region aus, welche an den besonderen Fähigkeiten von IgG3-Antikörpern zur Komplementaktivierung beteiligt zu sein scheint. Diese erweiterte *hinge* Region ermöglicht es jedoch, dass Serum- oder Zell- assoziierte aber auch bakterielle Proteasen besonders effektiv in dieser Region ihre proteolytischen Aktivitäten entfalten können. Daher wird davon ausgegangen, dass Antikörper vom IgG3-Isotyp im Vergleich mit den übrigen IgG-Isotypen anfällig gegenüber diesen Proteasen sind. Auffällig war bei früheren Studien von Molla et al., dass insbesondere die Lysin-bindenden Proteasen deutlich effizienter IgG3 als IgG1 proteolytisch gespalten haben. Dies ließ sich wiederum durch die verlängerte *hinge* Region erklären. Durch die Verlängerung in der *hinge* Region kommt es hier beim IgG3 zu einer Anhäufung von Lysinresten, welche Bindestellen für diverse Proteasen darstellen (Baici et al., 1982; Molla et al., 1988; Tao and Morrison, 1989).

Die verlängerte *hinge* Region des IgG3-Antikörpers scheint zwar die Zugänglichkeit für Proteasen zu erhöhen, hat jedoch auch positive Auswirkungen auf die Stabilität von IgG3-Antikörpern. Rispen et al. konnten zeigen, dass IgG3 im Gegensatz zu IgG4, deutlich ineffizienter dem Phänomen des „Fab-Arm-Exchanges“ unterlegen war. Hierbei kommt es zu einem Bruch der Disulfidbrücke zwischen den beiden schweren Ketten, so dass halbe Antikörpermoleküle entstehen, welche sich nun wiederum mit anderen Halbmolekülen zu ganzen Antikörpern zusammenlagern können. Dieser Mechanismus bedingt, dass *in vivo* eine große Anzahl von „bispesifischen“ Antikörpermolekülen entsteht. Innerhalb von Antikörpern des IgG3-Isotyps wird in der *hinge* Region eine hohe Anzahl an Disulfidbrücken zwischen den beiden schweren Ketten ausgebildet, so dass im Gegensatz zu IgG4-Antikörpern IgG3-Moleküle deutlich seltener in Halb-Antikörper überführt werden (Rispen et al., 2014).

5.6.2 Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität durch IgG3

Neben der Komplementaktivierung kann auch der als *ADCC* bezeichnete Effektormechanismus eine wichtige Rolle für das therapeutische Potential von monoklonalen Antikörpern spielen. *ADCC* wird durch die Bindung des Antikörper Fc-Teils an Fc-Rezeptoren auf Effektorzellen induziert. Unter den IgG-Isotypen zeigt IgG3 zwar die höchste Affinität zu den jeweiligen Fc-Rezeptoren (Bruhns et al., 2009), die Ergebnisse von *ADCC*-Studien fallen jedoch unterschiedlich aus. Frühere Studien von Michaelsen et al. zur IgG3-

induzierten *ADCC* zeigten, dass sich IgG1 und IgG3 nicht unterschieden (Michaelsen et al., 1992). Im Gegensatz zu den Studien von Michaelsen et al. zeigten die Ergebnisse von Niwa et al. und Dechant et al., dass IgG3 schlechter *ADCC* induzierte als IgG1 (Niwa et al., 2005; Dechant et al., 2002). Die Ergebnisse dieser Studien müssen jedoch vorsichtig betrachtet werden und können nicht direkt mit einander verglichen werden, da unterschiedliche Zielantigene adressiert wurden.

Zudem könnten sich große Unterschiede in der IgG3-induzierten *ADCC* mit Granulozyten im Vergleich zu Antikörpern des IgG1- und des IgG2-Isotyps zeigen. Granulozyten exprimieren als Fc-Rezeptoren unter anderem Fc γ RIIa (CD32a) und Fc γ RIIIb (CD16b). Auf Grund der sehr hohen Affinität von Antikörpern des IgG3-Isotyps zu CD16b ist es vorstellbar, dass die Granulozyten-abhängige *ADCC* durch IgG3-Antikörper deutlich eingeschränkt sein könnte, da Antikörper von IgG3-Isotyp hauptsächlich CD16b anstatt des *ADCC*-induzierenden CD32a binden. Ähnliche Ergebnisse konnten im Hintergrund von CD16-optimierten IgG1-Molekülen erzielt werden. Hierbei wurde mittels ortsspezifischer Mutagenese die Affinität der IgG1-Antikörper zu CD16, dem nach auch zu CD16b, erhöht. Als Folge dieser Mutation wurde die *ADCC* mit natürlichen Killerzellen durch die erhöhte Affinität zu CD16a gesteigert. Die Granulozyten vermittelte *ADCC* durch CD32 kam jedoch zum Erliegen. Das Einführen weiterer Mutationen im Fc-Teil der CD16-optimierten IgG1-Antikörper, welche wiederum die Affinität zu CD32 erhöhten, konnten die Granulozyten-induzierte *ADCC* wieder herstellen (Derer et al., 2014c).

5.6.3 IgG3 als Strategie zur Verbesserung der Komplementaktivierung

Die in dieser Arbeit generierte IgG3-Variante von Cetuximab induzierte im Gegensatz zu dem parentalen IgG1 eine deutlich effizientere C1q-Anlagerung und in Abhängigkeit von der Expression des *mCRP* CD55 *CDC* gegenüber EGFR-positiven Zellen. In den vergangenen Jahren wurden verschiedene Strategien zur Verbesserung der Komplementaktivierung durch monoklonale Antikörper beschrieben. Zu diesen unterschiedlichen Strategien gehört auch das sogenannte „Fc-Engineering“. Hierbei werden die konstanten Teile der Antikörper durch Aminosäuresubstitutionen oder Änderungen in der Glykosylierung modifiziert. Im Falle einer Verbesserung der Komplementaktivierung durch Fc-Modifikationen kommt es zu einer effizienteren Anlagerung von C1q an die modifizierten CH2-Domänen der mAk (Idusogie et al., 2001; Moore et al., 2010).

Eine weitere Möglichkeit zielt auf eine effizientere C1q-Anlagerung durch die Ausbildung von IgM-ähnlichen hexameren Strukturen durch Antikörper des IgG1-Isotyps ab. Hierbei

wird im Fc-Teil der IgG1-Antikörper eine Mutation eingeführt, welche die Affinität der einzelnen Fc-Teile unterschiedlicher IgG1-Moleküle zu einander erhöht und so die Hexamerisierung voran treibt (Diebolder et al., 2014). Des Weiteren wurden auch chimäre Moleküle aus Antikörpern des IgG1- und IgG3-Isotyps erstellt (Natsume et al., 2009). Im Vergleich der Fc-Modifikations-Strategien mit einem IgG3-Antikörper wird ein grundsätzlicher Unterschied deutlich. Bei Antikörpern des IgG3-Isotyps handelt es sich um humane nicht modifizierte Immunglobuline. Bei den Fc-Modifikations-Strategien wurden künstlich Aminosäuren oder Glykosylierungen im Fc-Rückgrat des Antikörpers getauscht oder eingefügt, so dass diese Modifikationen zur Ausbildung eines sogenannten Neoepitops führen können. Diese Neoepitope können folglich immunogen auf den Organismus wirken und eine Immunreaktion auslösen. Da nicht modifizierte Antikörper des IgG3-Isotyps natürlicher Weise im humanen Organismus vorkommen, besitzen sie daher auch ein geringeres immunogenes Potential als Fc-optimierte Antikörper. Das immunogene Potential von Antikörpern des IgG3-Isotyps hängt jedoch vom verwendeten Allotyp ab. Es ist denkbar, dass ein IgG3-Antikörper patientenspezifisch immunogen sein kann, falls der verwendete Allotyp nicht natürlicher Weise von dem Patienten exprimiert wird (Ducanel Muller 2012).

Antikörper vom IgG3-Isotyp zeigen zwar gegenüber den einzelnen Fc-optimierten Antikörpern potentielle Vorteile in Bezug auf ein immunogenes Potential. Es zeigen sich jedoch auch Probleme, insbesondere für den in dieser Arbeit untersuchten anti-EGFR-IgG3. Interessanterweise ist die anti-EGFR-IgG3 induzierte Komplementaktivierung stark reguliert durch *mCRPs*, wie CD55. Ob eine solche extreme Abhängigkeit auch für Fc-optimierte Antikörper vorherrscht, wurde bis lang noch nicht nachgewiesen.

5.6.4 Der therapeutische Einfluss von CD55 auf Antikörper vom IgG3-Isotyp

CD55 als Regulator des Komplementsystems wird von nahezu jedem Serum-exponierten Zelltyp exprimiert. Studien zur Expression von CD55 auf Tumorzellen konnten zeigen, dass es bei Tumoren zu einer Dysregulation in der CD55-Expression kommen kann. Hierbei wurden sowohl Tumore beschrieben, welche CD55 herauf- als auch herunterregulierten. Zudem konnten einige Studien zeigen, dass eine CD55-Überexpression mit einer schlechten Prognose von Tumorerkrankungen der Brust, Gallenblase und des Kolons einhergehen kann (Durrant et al., 2003; Ikeda et al., 2008; Wu et al., 2012).

Koretz et al untersuchten immunhistochemisch Biopsien von Patienten mit kolorektalem Karzinom auf die Expression von CD55. Hierbei zeigte sich, dass die malignen Gewebe im Gegensatz zu normalen Geweben eine deutlich erhöhte CD55-Expression aufwiesen. Die Art der CD55-Expression war jedoch sehr heterogen, so dass sich die CD55-Expression von

Patientenprobe zu Patientenprobe stark unterschied (Koretz et al., 1992). Interessanterweise induzierte anti-EGFR-IgG3 die höchste CDC gegenüber den kolorektalen DiFi Karzinomzellen, welche unter allen untersuchten humanen Zelllinien die geringste CD55 Expression aufwies. Anti-EGFR-IgG3 könnte demnach als Therapeutikum vor allem zur Behandlung von CD55 niedrig exprimierenden oder CD55 negativen Tumoren eingesetzt werden. Medikamenten-bezogene Biomarker können Hinweise liefern, ob ein Therapeutikum bei bestimmten Patienten wirksam ist. Zudem geben sie Aufschluss über die Art und Weise des Wirkmechanismus des Medikaments. Daher könnte CD55 als potentieller Biomarker innerhalb einer anti-EGFR-IgG3 basierten Therapie fungieren.

5.7 Zukünftige Vorhaben

5.7.1 Generierung einer Tumor-spezifischen Variante des IgG3-Antikörpers

Der EGFR stellt kein Tumor-spezifisches Antigen dar, da eine Expression auch auf normalen Geweben der Leber, Haut oder des Gastrointestinaltraktes vorliegt. Dem entsprechend tritt innerhalb dieser Gewebe auch die höchste durch EGFR-gerichtete therapeutische Antikörper induzierte Toxizität auf. Antikörper, welche eine Tumor-spezifische Variante des EGFR erkennen, sollten der Theorie nach ein geringeres Ausmaß an Toxizität induzieren. Zu diesen Tumor-spezifischen Varianten des EGFR zählt die EGFRvIII-Variante. Hierbei kam es durch eine Deletion der Exonen 2 bis 7 im *egfr*-Gen zu einer verkürzten Variante des EGFR, welche nur auf malignen Geweben exprimiert vorliegt. Daher soll in der Zukunft ein EGFRvIII-gerichteter Antikörper vom IgG3-Isotyp generiert werden und insbesondere in Bezug auf seine komplementaktivierenden Fähigkeiten untersucht werden.

5.7.2 Quantifizierung von CD55 / CD59 auf primären soliden Tumoren zur Identifizierung von Biomarkern einer potentiellen IgG3-abhängigen Immuntherapie

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die anti-EGFR-IgG3-induzierte komplementvermittelte Lyse negativ mit der Expression von CD55 bzw. CD59 korrelierte. Daher sollen im nächsten Schritt die Expressionslevel von CD55 und CD59 auf verschiedenen Tumor-Entitäten untersucht werden. An Hand dieser Daten sollen potentielle sensitive Tumor-Arten identifiziert werden, welche sukzessibel gegenüber einer anti-EGFR-IgG3-induzierten Komplementaktivierung sind.

6 Zusammenfassung

Das Komplementsystem stellt einen hoch konservierten Teil des angeborenen Immunsystems dar und spielt eine wichtige Rolle bei der Abwehr und Beseitigung von Pathogenen und malignen wie auch apoptotischen Zellen. Durch die Bindung von C1q an zielzellgebundene Antikörper wird die klassische komplementabhängige Lyse oder *CDC* (engl. *complement dependent cytotoxicity*, *CDC*) initiiert. Im Vergleich mit den übrigen IgG-Isotypen besitzt IgG3 eine größere molekulare Flexibilität und eine stärkere Fähigkeit, C1q zu binden. Interessanterweise induzieren IgG3 Antikörper verglichen mit IgG1 Antikörpern nicht konsequenterweise eine bessere *CDC*. Auf Grund dieser widersprüchlichen Daten war das Ziel dieser Arbeit, die molekularen Eigenschaften einer IgG1 sowie einer IgG3 induzierten Komplementaktivierung zu analysieren. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit vom therapeutischen monoklonalen Antikörper Cetuximab, welcher den EGFR (engl. *epidermal growth factor receptor*, EGFR) als Ziel hat, eine IgG1- wie auch eine IgG3-Variante erstellt. Sowohl IgG1 als auch IgG3 zeigten ähnliche Eigenschaften in der EGFR-Bindung und waren ähnlich effektiv bei der Induktion einer Wachstumsinhibition von EGFR-positiven Zellen. Daher konnte davon ausgegangen werden, dass die Antikörper identische Fab-vermittelte Effekte induzierten. Im Gegensatz zum IgG1, welcher keine *CDC* gegenüber allen untersuchten Zelllinien vermittelte, induzierte anti-EGFR-IgG3 signifikante *CDC* gegenüber einigen, aber nicht allen untersuchten Zelllinien. Des Weiteren konnten Experimente zeigen, dass die anti-EGFR-IgG3 induzierte *CDC* negativ mit der Expression der membranständigen komplementregulatorischen Proteine (engl. *membrane-bound complement regulatory proteins*, *mCRPs*) CD55 und CD59 korrelierte, wobei die Expression von CD46 keinerlei Auswirkung auf die *CDC* durch anti-EGFR-IgG3 hatte. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass anti-EGFR-IgG3, trotz einer relativ effizienten C1q- und C3b- Anlagerung, deutlich ineffektiver C4b wie auch C5b-9 auf den untersuchten Zellen deponierte als eine Positivkontrolle aus zwei nicht epitopüberlappenden anti-EGFR-IgG1 Molekülen. Anti-EGFR-IgG3 induzierte auf allen untersuchten Zellen zwar eine Freisetzung von C4a, aber gegenüber Zellen, welche hohe CD55 und CD59 Expressionslevel aufwiesen, erzielte anti-EGFR-IgG3 keine Freisetzung von C3a und C5a. Mittels siRNA-vermittelter Herunterregulierung und Überexpressionsexperimenten von *mCRPs* konnte CD55 als entscheidender Faktor der anti-EGFR-IgG3 induzierten *CDC* identifiziert werden. Des

Zusammenfassung

Weiteren induzierte die Expression von CD55 einen Wechsel von klassischer zu alternativer Komplementaktivierung, welche weiterhin in Abhängigkeit von C1q stand.

Zusammenfassend, ein humaner anti-EGFR-IgG3 induzierte äußerst effizient Komplementaktivierung gegenüber EGFR-positiven Zellen. Trotz einer sehr starken C1q-Anlagerung, vermittelte anti-EGFR-IgG3 nur geringfügig die Zusammenlagerung klassischer C3- und C5-Konvertasen. Zudem war CD55 der entscheidende Regulator der Komplementaktivierung durch anti-EGFR-IgG3 und bedingte, dass anti-EGFR-IgG3 hauptsächlich den alternativen Komplementweg aktivierte.

7 Summary

The complement system constitutes a highly conserved part of the innate immunosystem and plays an important role in the killing of invading pathogens as well as in the clearance of malignant or apoptotic cells. Binding of C1q to target-bound antibody initiates classical complement dependent cytotoxicity (CDC). Among the different IgG isotypes it is commonly accepted that IgG3 displays a higher molecular flexibility and a higher C1q binding ability in comparison with IgG1. Interestingly, IgG3 does not regularly initiate superior complement activation and lysis compared to IgG1. As a result of these contradictory data, the aim of this study was to analyze and determine molecular features of IgG1- as well as of IgG3-driven complement activation. Therefore, we created a matched pair of isotype variants of the therapeutic monoclonal antibody Cetuximab, which targets the epidermal growth factor receptor (EGFR).

Both IgG1 and IgG3 Abs displayed similar binding to EGFR and similar efficiency in mediating growth inhibition of EGFR-positive cells – indicating that Fab-mediated effector mechanisms were similar. In contrast to anti-EGFR-IgG1, which did not promote CDC against any of the investigated target cell lines, anti-EGFR-IgG3 initiated significant complement activation and lysis of some, but not all analyzed cell lines. Further experiments demonstrated that anti-EGFR-IgG3-triggered CDC negatively correlated with expression levels of the membrane-bound complement regulatory proteins (mCRPs) CD55 and CD59. Interestingly, CD46 expression did not affect anti-EGFR-IgG3 induced CDC. Additionally, anti-EGFR-IgG3 induced relative strong C1q and C3b deposition, but was notably less effective in depositing C4b and C5b-9 on analyzed cells compared to a combination of non-epitope overlapping anti-EGFR-IgG1s, which served in this study as a positive control. Moreover, anti-EGFR-IgG3 triggered a significant release of C4a on all investigated cells, while it failed to induce C3a as well as C5a release on cells expressing high amounts of CD55 and CD59. Furthermore, RNA interference-induced knockdown or overexpression experiments of mCRPs revealed, that CD55 expression is a crucial determinant of anti-EGFR-IgG3-triggered CDC. Thus, CD55 expression induced a switch from classical complement pathway activation to C1q-dependent alternative pathway amplification.

In conclusion, human anti-EGFR-IgG3 was highly efficient in complement recruitment against EGFR-positive cells. Despite being highly reactive with C1q, anti-EGFR-IgG3 promoted a rather weak assembly of classical C3 as well as C5 convertases. This reactivity was regulated by the presence of CD55, which forced human anti-EGFR-IgG3 to act mainly through the alternative pathway.

8 Literaturverzeichnis

Albrecht, E.A., Chinnaiyan, A.M., Varambally, S., Kumar-Sinha, C., Barrette, T.R., Sarma, J.V., and Ward, P.A. (2004). C5a-induced gene expression in human umbilical vein endothelial cells. *Am. J. Pathol.* *164*, 849–859.

Alcolea, J.M., Antón, L.C., Marqués, G., Sánchez-Corral, P., and Vivanco, F. (1987). Formation of covalent complexes between the fourth component of human complement and IgG immune aggregates. *Complement Basel Switz.* *4*, 21–32.

Allegra, C.J., Jessup, J.M., Somerfield, M.R., Hamilton, S.R., Hammond, E.H., Hayes, D.F., McAllister, P.K., Morton, R.F., and Schilsky, R.L. (2009). 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. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *27*, 2091–2096.

Amado, R.G., Wolf, M., Peeters, M., Van Cutsem, E., Siena, S., Freeman, D.J., Juan, T., Sikorski, R., Suggs, S., Radinsky, R., et al. (2008). Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *26*, 1626–1634.

Baici, A., Knöpfel, M., and Fehr, K. (1982). Cleavage of the four human IgG subclasses with cathepsin G. *Scand. J. Immunol.* *16*, 487–498.

Beurskens, F.J., Lindorfer, M.A., Farooqui, M., Beum, P.V., Engelberts, P., Mackus, W.J.M., Parren, P.W.H.I., Wiestner, A., and Taylor, R.P. (2012). Exhaustion of cytotoxic effector systems may limit monoclonal antibody-based immunotherapy in cancer patients. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *188*, 3532–3541.

Bindon, C.I., Hale, G., Brüggemann, M., and Waldmann, H. (1988). Human monoclonal IgG isotypes differ in complement activating function at the level of C4 as well as C1q. *J. Exp. Med.* *168*, 127–142.

Bindon, C.I., Hale, G., and Waldmann, H. (1990). Complement activation by immunoglobulin does not depend solely on C1q binding. *Eur. J. Immunol.* *20*, 277–281.

Borsos, T., and Rapp, H.J. (1965). Complement fixation on cell surfaces by 19S and 7S antibodies. *Science* *150*, 505–506.

Brekke, O.H., Bremnes, B., Sandin, R., Aase, A., Michaelsen, T.E., and Sandlie, I. (1993). Human IgG3 can adopt the disulfide bond pattern characteristic for IgG1 without resembling it in complement mediated cell lysis. *Mol. Immunol.* *30*, 1419–1425.

Brekke, O.H., Michaelsen, T.E., and Sandlie, I. (1995). The structural requirements for complement activation by IgG: does it hinge on the hinge? *Immunol. Today* *16*, 85–90.

Brüggemann, M., Williams, G.T., Bindon, C.I., Clark, M.R., Walker, M.R., Jefferis, R., Waldmann, H., and Neuberger, M.S. (1987). Comparison of the effector functions of human immunoglobulins using a matched set of chimeric antibodies. *J. Exp. Med.* *166*, 1351–1361.

- Bruhns, P., Iannascoli, B., England, P., Mancardi, D.A., Fernandez, N., Jorieux, S., and Daëron, M. (2009). Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood* 113, 3716–3725.
- Campbell, R.D., Dodds, A.W., and Porter, R.R. (1980). The binding of human complement component C4 to antibody-antigen aggregates. *Biochem. J.* 189, 67–80.
- Ciardiello, F., and Tortora, G. (2008). EGFR antagonists in cancer treatment. *N. Engl. J. Med.* 358, 1160–1174.
- Citri, A., and Yarden, Y. (2006). EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 505–516.
- Cohen, S., Carpenter, G., and King, L. (1980). Epidermal growth factor-receptor-protein kinase interactions. Co-purification of receptor and epidermal growth factor-enhanced phosphorylation activity. *J. Biol. Chem.* 255, 4834–4842.
- Cullen, S.P., and Martin, S.J. (2008). Mechanisms of granule-dependent killing. *Cell Death Differ.* 15, 251–262.
- Van Cutsem, E., Köhne, C.-H., Hitre, E., Zaluski, J., Chang Chien, C.-R., Makhson, A., D’Haens, G., Pintér, T., Lim, R., Bodoky, G., et al. (2009). Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 360, 1408–1417.
- Dall’Acqua, W.F., Cook, K.E., Damschroder, M.M., Woods, R.M., and Wu, H. (2006). Modulation of the effector functions of a human IgG1 through engineering of its hinge region. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 177, 1129–1138.
- Dangl, J.L., Wensel, T.G., Morrison, S.L., Stryer, L., Herzenberg, L.A., and Oi, V.T. (1988). Segmental flexibility and complement fixation of genetically engineered chimeric human, rabbit and mouse antibodies. *EMBO J.* 7, 1989–1994.
- Dechant, M., Vidarsson, G., Stockmeyer, B., Repp, R., Glennie, M.J., Gramatzki, M., van De Winkel, J.G.J., and Valerius, T. (2002). Chimeric IgA antibodies against HLA class II effectively trigger lymphoma cell killing. *Blood* 100, 4574–4580.
- Dechant, M., Beyer, T., Schneider-Merck, T., Weisner, W., Peipp, M., van de Winkel, J.G.J., and Valerius, T. (2007). Effector mechanisms of recombinant IgA antibodies against epidermal growth factor receptor. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 179, 2936–2943.
- Dechant, M., Weisner, W., Berger, S., Peipp, M., Beyer, T., Schneider-Merck, T., Lammerts van Bueren, J.J., Bleeker, W.K., Parren, P.W.H.I., van de Winkel, J.G.J., et al. (2008). Complement-dependent tumor cell lysis triggered by combinations of epidermal growth factor receptor antibodies. *Cancer Res.* 68, 4998–5003.
- Derer, S., Berger, S., Schlaeth, M., Schneider-Merck, T., Klausz, K., Lohse, S., Overdijk, M.B., Dechant, M., Kellner, C., Nagelmeier, I., et al. (2012a). Oncogenic KRAS impairs EGFR antibodies’ efficiency by C/EBPβ-dependent suppression of EGFR expression. *Neoplasia N. Y. N* 14, 190–205.
- Derer, S., Bauer, P., Lohse, S., Scheel, A.H., Berger, S., Kellner, C., Peipp, M., and Valerius, T. (2012b). Impact of epidermal growth factor receptor (EGFR) cell surface expression levels on effector mechanisms of EGFR antibodies. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 189, 5230–5239.

Abkürzungsverzeichnis

- Derer, S., Beurskens, F.J., Rosner, T., Peipp, M., and Valerius, T. (2014a). Complement in antibody-based tumor therapy. *Crit. Rev. Immunol.* *34*, 199–214.
- Derer, S., Kellner, C., Rösner, T., Klausz, K., Glorius, P., Valerius, T., and Peipp, M. (2014b). Fc engineering of antibodies and antibody derivatives by primary sequence alteration and their functional characterization. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *1131*, 525–540.
- Derer, S., Glorius, P., Schlaeth, M., Lohse, S., Klausz, K., Muchhal, U., Desjarlais, J.R., Humpe, A., Valerius, T., and Peipp, M. (2014c). Increasing Fc γ RIIa affinity of an Fc γ RIII-optimized anti-EGFR antibody restores neutrophil-mediated cytotoxicity. *mAbs* *6*, 409–421.
- Diebolder, C.A., Beurskens, F.J., de Jong, R.N., Koning, R.I., Strumane, K., Lindorfer, M.A., Voorhorst, M., Ugurlar, D., Rosati, S., Heck, A.J.R., et al. (2014). Complement is activated by IgG hexamers assembled at the cell surface. *Science* *343*, 1260–1263.
- Dodds, A.W., Ren, X.D., Willis, A.C., and Law, S.K. (1996). The reaction mechanism of the internal thioester in the human complement component C4. *Nature* *379*, 177–179.
- Dougan, M., and Dranoff, G. (2009). Immune therapy for cancer. *Annu. Rev. Immunol.* *27*, 83–117.
- Douillard, J.-Y., Siena, S., Cassidy, J., Tabernero, J., Burkes, R., Barugel, M., Humblet, Y., Bodoky, G., Cunningham, D., Jassem, J., et al. (2010). Randomized, phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX4) versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: the PRIME study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *28*, 4697–4705.
- Duncan, A.R., and Winter, G. (1988). The binding site for C1q on IgG. *Nature* *332*, 738–740.
- Dunkelberger, J.R., and Song, W.-C. (2010). Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res.* *20*, 34–50.
- Durrant, L.G., Chapman, M.A., Buckley, D.J., Spendlove, I., Robins, R.A., and Armitage, N.C. (2003). Enhanced expression of the complement regulatory protein CD55 predicts a poor prognosis in colorectal cancer patients. *Cancer Immunol. Immunother. CII* *52*, 638–642.
- Fishelson, Z., Donin, N., Zell, S., Schultz, S., and Kirschfink, M. (2003). Obstacles to cancer immunotherapy: expression of membrane complement regulatory proteins (mCRPs) in tumors. *Mol. Immunol.* *40*, 109–123.
- Foreman, K.E., Glovsky, M.M., Warner, R.L., Horvath, S.J., and Ward, P.A. (1996). Comparative effect of C3a and C5a on adhesion molecule expression on neutrophils and endothelial cells. *Inflammation* *20*, 1–9.
- Fujita, T., Matsushita, M., and Endo, Y. (2004). The lectin-complement pathway--its role in innate immunity and evolution. *Immunol. Rev.* *198*, 185–202.
- Garred, P., Michaelsen, T.E., and Aase, A. (1989a). The IgG subclass pattern of complement activation depends on epitope density and antibody and complement concentration. *Scand. J. Immunol.* *30*, 379–382.

Garred, P., Michaelsen, T.E., and Aase, A. (1989b). The IgG subclass pattern of complement activation depends on epitope density and antibody and complement concentration. *Scand. J. Immunol.* *30*, 379–382.

Gelderman, K.A., Blok, V.T., Fleuren, G.J., and Gorter, A. (2002). The inhibitory effect of CD46, CD55, and CD59 on complement activation after immunotherapeutic treatment of cervical carcinoma cells with monoclonal antibodies or bispecific monoclonal antibodies. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *82*, 483–493.

Gelderman, K.A., Tomlinson, S., Ross, G.D., and Gorter, A. (2004). Complement function in mAb-mediated cancer immunotherapy. *Trends Immunol.* *25*, 158–164.

Gelderman, K.A., Lam, S., Sier, C.F., and Gorter, A. (2006). Cross-linking tumor cells with effector cells via CD55 with a bispecific mAb induces beta-glucan-dependent CR3-dependent cellular cytotoxicity. *Eur. J. Immunol.* *36*, 977–984.

Et Gengou, B. (1901). Sur l'existence de substances sensibilisatrices dans la plupart des sérums antimicrobiens. In *Annales de L'institut Pasteur*, p. 292.

Ghebrehiwet, B., Silverberg, M., and Kaplan, A.P. (1981). Activation of the classical pathway of complement by Hageman factor fragment. *J. Exp. Med.* *153*, 665–676.

Giuntini, S., Reason, D.C., and Granoff, D.M. (2012). Combined roles of human IgG subclass, alternative complement pathway activation, and epitope density in the bactericidal activity of antibodies to meningococcal factor h binding protein. *Infect. Immun.* *80*, 187–194.

Glennie, M.J., French, R.R., Cragg, M.S., and Taylor, R.P. (2007). Mechanisms of killing by anti-CD20 monoclonal antibodies. *Mol. Immunol.* *44*, 3823–3837.

Hadders, M.A., Bubeck, D., Roversi, P., Hakobyan, S., Forneris, F., Morgan, B.P., Pangburn, M.K., Llorca, O., Lea, S.M., and Gros, P. (2012). Assembly and regulation of the membrane attack complex based on structures of C5b6 and sC5b9. *Cell Rep.* *1*, 200–207.

Hajishengallis, G., and Lambris, J.D. (2010). Crosstalk pathways between Toll-like receptors and the complement system. *Trends Immunol.* *31*, 154–163.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* *100*, 57–70.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* *144*, 646–674.

Harboe, M., and Mollnes, T.E. (2008). The alternative complement pathway revisited. *J. Cell. Mol. Med.* *12*, 1074–1084.

Harboe, M., Ulvund, G., Vien, L., Fung, M., and Mollnes, T.E. (2004). The quantitative role of alternative pathway amplification in classical pathway induced terminal complement activation. *Clin. Exp. Immunol.* *138*, 439–446.

Harboe, M., Garred, P., Karlstrøm, E., Lindstad, J.K., Stahl, G.L., and Mollnes, T.E. (2009). The down-stream effects of mannan-induced lectin complement pathway activation depend quantitatively on alternative pathway amplification. *Mol. Immunol.* *47*, 373–380.

Harris, C.L., Kan, K.S., Stevenson, G.T., and Morgan, B.P. (1997). Tumour cell killing using chemically engineered antibody constructs specific for tumour cells and the complement inhibitor CD59. *Clin. Exp. Immunol.* *107*, 364–371.

Harris, C.L., Abbott, R.J.M., Smith, R.A., Morgan, B.P., and Lea, S.M. (2005). Molecular dissection of interactions between components of the alternative pathway of complement and decay accelerating factor (CD55). *J. Biol. Chem.* *280*, 2569–2578.

Harris, C.L., Pettigrew, D.M., Lea, S.M., and Morgan, B.P. (2007). Decay-accelerating factor must bind both components of the complement alternative pathway C3 convertase to mediate efficient decay. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *178*, 352–359.

Harris, R.C., Chung, E., and Coffey, R.J. (2003). EGF receptor ligands. *Exp. Cell Res.* *284*, 2–13.

Helmy, K.Y., Katschke, K.J., Gorgani, N.N., Kljavin, N.M., Elliott, J.M., Diehl, L., Scales, S.J., Ghilardi, N., and van Lookeren Campagne, M. (2006). CRIG: a macrophage complement receptor required for phagocytosis of circulating pathogens. *Cell* *124*, 915–927.

Hsu, Y.-F., Ajona, D., Corrales, L., Lopez-Picazo, J.M., Gurrpide, A., Montuenga, L.M., and Pio, R. (2010). Complement activation mediates cetuximab inhibition of non-small cell lung cancer tumor growth in vivo. *Mol. Cancer* *9*, 139.

Idusogie, E.E., Presta, L.G., Gazzano-Santoro, H., Totpal, K., Wong, P.Y., Ultsch, M., Meng, Y.G., and Mulkerrin, M.G. (2000). Mapping of the C1q binding site on rituxan, a chimeric antibody with a human IgG1 Fc. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *164*, 4178–4184.

Idusogie, E.E., Wong, P.Y., Presta, L.G., Gazzano-Santoro, H., Totpal, K., Ultsch, M., and Mulkerrin, M.G. (2001). Engineered antibodies with increased activity to recruit complement. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *166*, 2571–2575.

Ikeda, J.-I., Morii, E., Liu, Y., Qiu, Y., Nakamichi, N., Jokoji, R., Miyoshi, Y., Noguchi, S., and Aozasa, K. (2008). Prognostic significance of CD55 expression in breast cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *14*, 4780–4786.

Jin, X., Ding, H., Ding, N., Fu, Z., Song, Y., and Zhu, J. (2012). Homozygous A polymorphism of the complement C1qA276 correlates with prolonged overall survival in patients with diffuse large B cell lymphoma treated with R-CHOP. *J. Hematol. Oncol.* *J Hematol Oncol* *5*, 51.

Jones, B.M. (1979). The quantitation of alternative pathway complement function by timed lysis assay. *J. Immunol. Methods* *29*, 287–292.

Kennedy, A.D., Beum, P.V., Solga, M.D., DiLillo, D.J., Lindorfer, M.A., Hess, C.E., Densmore, J.J., Williams, M.E., and Taylor, R.P. (2004). Rituximab infusion promotes rapid complement depletion and acute CD20 loss in chronic lymphocytic leukemia. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *172*, 3280–3288.

Kerr, M.A. (1980). The human complement system: assembly of the classical pathway C3 convertase. *Biochem. J.* *189*, 173–181.

Klausz, K., Berger, S., Lammerts van Bueren, J.J., Derer, S., Lohse, S., Dechant, M., van de Winkel, J.G.J., Peipp, M., Parren, P.W.H.I., and Valerius, T. (2011). Complement-mediated

tumor-specific cell lysis by antibody combinations targeting epidermal growth factor receptor (EGFR) and its variant III (EGFRvIII). *Cancer Sci.* 102, 1761–1768.

Klepfish, A., Schattner, A., Ghoti, H., and Rachmilewitz, E.A. (2007). Addition of fresh frozen plasma as a source of complement to rituximab in advanced chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet Oncol.* 8, 361–362.

Klos, A., Tenner, A.J., Johswich, K.-O., Ager, R.R., Reis, E.S., and Köhl, J. (2009). The role of the anaphylatoxins in health and disease. *Mol. Immunol.* 46, 2753–2766.

Kojima, A., Iwata, K., Seya, T., Matsumoto, M., Ariga, H., Atkinson, J.P., and Nagasawa, S. (1993). Membrane cofactor protein (CD46) protects cells predominantly from alternative complement pathway-mediated C3-fragment deposition and cytolysis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 151, 1519–1527.

van der Kolk, L.E., Grillo-López, A.J., Baars, J.W., Hack, C.E., and van Oers, M.H. (2001). Complement activation plays a key role in the side-effects of rituximab treatment. *Br. J. Haematol.* 115, 807–811.

Koretz, K., Brüderlein, S., Henne, C., and Möller, P. (1992). Decay-accelerating factor (DAF, CD55) in normal colorectal mucosa, adenomas and carcinomas. *Br. J. Cancer* 66, 810–814.

Kronvall, G., and Williams, R.C. (1969). Differences in anti-protein A activity among IgG subgroups. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 103, 828–833.

Lachmann, P.J. (2009). The amplification loop of the complement pathways. *Adv. Immunol.* 104, 115–149.

Lièvre, A., Bachet, J.-B., Boige, V., Cayre, A., Le Corre, D., Buc, E., Ychou, M., Bouché, O., Landi, B., Louvet, C., et al. (2008). KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 26, 374–379.

Liu, H., and May, K. (2012). Disulfide bond structures of IgG molecules: structural variations, chemical modifications and possible impacts to stability and biological function. *mAbs* 4, 17–23.

Lucisano Valim, Y.M., and Lachmann, P.J. (1991). The effect of antibody isotype and antigenic epitope density on the complement-fixing activity of immune complexes: a systematic study using chimaeric anti-NIP antibodies with human Fc regions. *Clin. Exp. Immunol.* 84, 1–8.

Lutz, H.U., and Jelezarova, E. (2006). Complement amplification revisited. *Mol. Immunol.* 43, 2–12.

Macor, P., Tripodo, C., Zorzet, S., Piovan, E., Bossi, F., Marzari, R., Amadori, A., and Tedesco, F. (2007). In vivo targeting of human neutralizing antibodies against CD55 and CD59 to lymphoma cells increases the antitumor activity of rituximab. *Cancer Res.* 67, 10556–10563.

Mamidi, S., Cinci, M., Hasmann, M., Fehring, V., and Kirschfink, M. (2013). Lipoplex mediated silencing of membrane regulators (CD46, CD55 and CD59) enhances complement-dependent anti-tumor activity of trastuzumab and pertuzumab. *Mol. Oncol.* 7, 580–594.

Markiewski, M.M., DeAngelis, R.A., Benencia, F., Ricklin-Lichtsteiner, S.K., Koutoulaki, A., Gerard, C., Coukos, G., and Lambris, J.D. (2008). Modulation of the antitumor immune response by complement. *Nat. Immunol.* *9*, 1225–1235.

Mendelsohn, J. (2002). Targeting the epidermal growth factor receptor for cancer therapy. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *20*, 1S – 13S.

Mendelsohn, J., and Baselga, J. (2003). Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *21*, 2787–2799.

Meri, S., Morgan, B.P., Davies, A., Daniels, R.H., Olavesen, M.G., Waldmann, H., and Lachmann, P.J. (1990). Human protectin (CD59), an 18,000-20,000 MW complement lysis restricting factor, inhibits C5b-8 catalysed insertion of C9 into lipid bilayers. *Immunology* *71*, 1–9.

Michaelsen, T.E., and Natvig, J.B. (1974). Unusual molecular properties of human IgG3 proteins due to an extended hinge region. *J. Biol. Chem.* *249*, 2778–2785.

Michaelsen, T.E., Aase, A., Westby, C., and Sandlie, I. (1990). Enhancement of complement activation and cytolysis of human IgG3 by deletion of hinge exons. *Scand. J. Immunol.* *32*, 517–528.

Michaelsen, T.E., Garred, P., and Aase, A. (1991). Human IgG subclass pattern of inducing complement-mediated cytolysis depends on antigen concentration and to a lesser extent on epitope patchiness, antibody affinity and complement concentration. *Eur. J. Immunol.* *21*, 11–16.

Michaelsen, T.E., Aase, A., Norderhaug, L., and Sandlie, I. (1992). Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity induced by chimeric mouse-human IgG subclasses and IgG3 antibodies with altered hinge region. *Mol. Immunol.* *29*, 319–326.

Michaelsen, T.E., Sandlie, I., Bratlie, D.B., Sandin, R.H., and Ihle, O. (2009). Structural difference in the complement activation site of human IgG1 and IgG3. *Scand. J. Immunol.* *70*, 553–564.

Molla, A., Kagimoto, T., and Maeda, H. (1988). Cleavage of immunoglobulin G (IgG) and IgA around the hinge region by proteases from *Serratia marcescens*. *Infect. Immun.* *56*, 916–920.

Mollnes, T.E., Høgåsen, K., Hoaas, B.F., Michaelsen, T.E., Garred, P., and Harboe, M. (1995). Inhibition of complement-mediated red cell lysis by immunoglobulins is dependent on the IG isotype and its C1 binding properties. *Scand. J. Immunol.* *41*, 449–456.

Moore, G.L., Chen, H., Karki, S., and Lazar, G.A. (2010). Engineered Fc variant antibodies with enhanced ability to recruit complement and mediate effector functions. *mAbs* *2*, 181–189.

Müller-Eberhard, H.J. (1988). Molecular organization and function of the complement system. *Annu. Rev. Biochem.* *57*, 321–347.

- Natsume, A., In, M., Takamura, H., Nakagawa, T., Shimizu, Y., Kitajima, K., Wakitani, M., Ohta, S., Satoh, M., Shitara, K., et al. (2008). Engineered antibodies of IgG1/IgG3 mixed isotype with enhanced cytotoxic activities. *Cancer Res.* *68*, 3863–3872.
- Natsume, A., Shimizu-Yokoyama, Y., Satoh, M., Shitara, K., and Niwa, R. (2009). Engineered anti-CD20 antibodies with enhanced complement-activating capacity mediate potent anti-lymphoma activity. *Cancer Sci.* *100*, 2411–2418.
- Nicholson-Weller, A., and Wang, C.E. (1994). Structure and function of decay accelerating factor CD55. *J. Lab. Clin. Med.* *123*, 485–491.
- Niculescu, F., Rus, H.G., Retegan, M., and Vlaicu, R. (1992). Persistent complement activation on tumor cells in breast cancer. *Am. J. Pathol.* *140*, 1039–1043.
- Niwa, R., Natsume, A., Uehara, A., Wakitani, M., Iida, S., Uchida, K., Satoh, M., and Shitara, K. (2005). IgG subclass-independent improvement of antibody-dependent cellular cytotoxicity by fucose removal from Asn297-linked oligosaccharides. *J. Immunol. Methods* *306*, 151–160.
- Oikonomopoulou, K., Ricklin, D., Ward, P.A., and Lambris, J.D. (2012). Interactions between coagulation and complement--their role in inflammation. *Semin. Immunopathol.* *34*, 151–165.
- Olafsen, T., Munthe Lund, C.K., Bruland, O.S., Sandlie, I., and Michaelsen, T.E. (1999). Complement-mediated lysis of cultured osteosarcoma cell lines using chimeric mouse/human TP-1 IgG1 and IgG3 antibodies. *Cancer Immunol. Immunother.* *CII 48*, 411–418.
- Painter, R.H. (1984). The C1q receptor site on human immunoglobulin G. *Can. J. Biochem. Cell Biol. Rev. Can. Biochim. Biol. Cell.* *62*, 418–425.
- Pangburn, M.K. (1986). Differences between the binding sites of the complement regulatory proteins DAF, CR1, and factor H on C3 convertases. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *136*, 2216–2221.
- Pangburn, M.K., and Rawal, N. (2002). Structure and function of complement C5 convertase enzymes. *Biochem. Soc. Trans.* *30*, 1006–1010.
- Peeters, M., Balfour, J., and Arnold, D. (2008). Review article: panitumumab--a fully human anti-EGFR monoclonal antibody for treatment of metastatic colorectal cancer. *Aliment. Pharmacol. Ther.* *28*, 269–281.
- Peipp, M., Dechant, M., and Valerius, T. (2008). Effector mechanisms of therapeutic antibodies against ErbB receptors. *Curr. Opin. Immunol.* *20*, 436–443.
- Pio, R., Ajona, D., and Lambris, J.D. (2013). Complement inhibition in cancer therapy. *Semin. Immunol.* *25*, 54–64.
- Pirker, R., Pereira, J.R., Szczesna, A., von Pawel, J., Krzakowski, M., Ramlau, R., Vynnychenko, I., Park, K., Yu, C.-T., Ganul, V., et al. (2009). Cetuximab plus chemotherapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer (FLEX): an open-label randomised phase III trial. *Lancet* *373*, 1525–1531.
- Pirker, R., Pereira, J.R., von Pawel, J., Krzakowski, M., Ramlau, R., Park, K., de Marinis, F., Eberhardt, W.E.E., Paz-Ares, L., Störkel, S., et al. (2012). EGFR expression as a predictor of

survival for first-line chemotherapy plus cetuximab in patients with advanced non-small-cell lung cancer: analysis of data from the phase 3 FLEX study. *Lancet Oncol.* *13*, 33–42.

Pumphrey, R. (1986). Computer models of the human immunoglobulins shape and segmental flexibility. *Immunol. Today* *7*, 174–178.

Racila, D.M., Sontheimer, C.J., Sheffield, A., Wisnieski, J.J., Racila, E., and Sontheimer, R.D. (2003). Homozygous single nucleotide polymorphism of the complement C1QA gene is associated with decreased levels of C1q in patients with subacute cutaneous lupus erythematosus. *Lupus* *12*, 124–132.

Racila, E., Link, B.K., Weng, W.-K., Witzig, T.E., Ansell, S., Maurer, M.J., Huang, J., Dahle, C., Halwani, A., Levy, R., et al. (2008). A polymorphism in the complement component C1qA correlates with prolonged response following rituximab therapy of follicular lymphoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *14*, 6697–6703.

Redpath, S., Michaelsen, T., Sandlie, I., and Clark, M.R. (1998). Activation of complement by human IgG1 and human IgG3 antibodies against the human leucocyte antigen CD52. *Immunology* *93*, 595–600.

Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K., and Lambris, J.D. (2010). Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat. Immunol.* *11*, 785–797.

Rispens, T., Davies, A.M., Ooijevaar-de Heer, P., Absalah, S., Bende, O., Sutton, B.J., Vidarsson, G., and Aalberse, R.C. (2014). Dynamics of inter-heavy chain interactions in human immunoglobulin G (IgG) subclasses studied by kinetic Fab arm exchange. *J. Biol. Chem.* *289*, 6098–6109.

Rösner, T., Derer, S., Kellner, C., Dechant, M., Lohse, S., Vidarsson, G., Peipp, M., and Valerius, T. (2013). An IgG3 switch variant of rituximab mediates enhanced complement-dependent cytotoxicity against tumour cells with low CD20 expression levels. *Br. J. Haematol.* *161*, 282–286.

Rösner, T., Lohse, S., Peipp, M., Valerius, T., and Derer, S. (2014). Epidermal growth factor receptor targeting IgG3 triggers complement-mediated lysis of decay-accelerating factor expressing tumor cells through the alternative pathway amplification loop. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *193*, 1485–1495.

Roux, K.H., Strelets, L., and Michaelsen, T.E. (1997). Flexibility of human IgG subclasses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *159*, 3372–3382.

Roux, K.H., Strelets, L., Brekke, O.H., Sandlie, I., and Michaelsen, T.E. (1998). Comparisons of the ability of human IgG3 hinge mutants, IgM, IgE, and IgA2, to form small immune complexes: a role for flexibility and geometry. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *161*, 4083–4090.

Sahu, A., and Pangburn, M.K. (1994). Covalent attachment of human complement C3 to IgG. Identification of the amino acid residue involved in ester linkage formation. *J. Biol. Chem.* *269*, 28997–29002.

Sandlie, I., and Michaelsen, T.E. (1991). Engineering monoclonal antibodies to determine the structural requirements for complement activation and complement mediated lysis. *Mol. Immunol.* *28*, 1361–1368.

- Schlaeth, M., Berger, S., Derer, S., Klausz, K., Lohse, S., Dechant, M., Lazar, G.A., Schneider-Merck, T., Peipp, M., and Valerius, T. (2010). Fc-engineered EGF-R antibodies mediate improved antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) against KRAS-mutated tumor cells. *Cancer Sci.* *101*, 1080–1088.
- Schlessinger, J. (2002). Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell* *110*, 669–672.
- Schneider-Merck, T., Lammerts van Bueren, J.J., Berger, S., Rossen, K., van Berkel, P.H.C., Derer, S., Beyer, T., Lohse, S., Bleeker, W.K., Peipp, M., et al. (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. Baltim. Md 1950* *184*, 512–520.
- Seya, T., and Atkinson, J.P. (1989). Functional properties of membrane cofactor protein of complement. *Biochem. J.* *264*, 581–588.
- Shang, Y., Chai, N., Gu, Y., Ding, L., Yang, Y., Zhou, J., Ren, G., Hao, X., Fan, D., Wu, K., et al. (2014). Systematic immunohistochemical analysis of the expression of CD46, CD55, and CD59 in colon cancer. *Arch. Pathol. Lab. Med.* *138*, 910–919.
- Shukla, A.A., and Thömmes, J. (2010). Recent advances in large-scale production of monoclonal antibodies and related proteins. *Trends Biotechnol.* *28*, 253–261.
- Sim, R.B., and Wallis, R. (2011). Surface properties: Immune attack on nanoparticles. *Nat. Nanotechnol.* *6*, 80–81.
- Sim, R.B., Twose, T.M., Paterson, D.S., and Sim, E. (1981). The covalent-binding reaction of complement component C3. *Biochem. J.* *193*, 115–127.
- Sliwkowski, M.X., and Mellman, I. (2013). Antibody therapeutics in cancer. *Science* *341*, 1192–1198.
- Stapleton, N.M., Andersen, J.T., Stemerding, A.M., Bjarnarson, S.P., Verheul, R.C., Gerritsen, J., Zhao, Y., Kleijer, M., Sandlie, I., de Haas, M., et al. (2011). Competition for FcRn-mediated transport gives rise to short half-life of human IgG3 and offers therapeutic potential. *Nat. Commun.* *2*, 599.
- Stover, C. (2010). Dual role of complement in tumour growth and metastasis (Review). *Int. J. Mol. Med.* *25*, 307–313.
- Tack, B.F. (1983). The beta-Cys-gamma-Glu thiolester bond in human C3, C4, and alpha 2-macroglobulin. *Springer Semin. Immunopathol.* *6*, 259–282.
- Tao, M.H., and Morrison, S.L. (1989). Studies of aglycosylated chimeric mouse-human IgG. Role of carbohydrate in the structure and effector functions mediated by the human IgG constant region. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *143*, 2595–2601.
- Teeling, J.L., French, R.R., Cragg, M.S., van den Brakel, J., Pluyter, M., Huang, H., Chan, C., Parren, P.W.H.I., Hack, C.E., Dechant, M., et al. (2004). Characterization of new human CD20 monoclonal antibodies with potent cytolytic activity against non-Hodgkin lymphomas. *Blood* *104*, 1793–1800.

- Tegla, C.A., Cudrici, C., Patel, S., Trippe, R., Rus, V., Niculescu, F., and Rus, H. (2011). MEMBRANE ATTACK BY COMPLEMENT: THE ASSEMBLY AND BIOLOGY OF TERMINAL COMPLEMENT COMPLEXES. *Immunol. Res.* 51, 45–60.
- Terui, Y., Sakurai, T., Mishima, Y., Mishima, Y., Sugimura, N., Sasaoka, C., Kojima, K., Yokoyama, M., Mizunuma, N., Takahashi, S., et al. (2006). Blockade of bulky lymphoma-associated CD55 expression by RNA interference overcomes resistance to complement-dependent cytotoxicity with rituximab. *Cancer Sci.* 97, 72–79.
- Tofte, R.W., Peterson, P.K., Kim, Y., and Quie, P.G. (1980). Influence of serum concentration on opsonization by the classical and alternative complement pathways. *Infect. Immun.* 27, 693–696.
- Trouw, L.A., Blom, A.M., and Gasque, P. (2008). Role of complement and complement regulators in the removal of apoptotic cells. *Mol. Immunol.* 45, 1199–1207.
- Vermorken, J.B., Mesia, R., Rivera, F., Remenar, E., Kawecki, A., Rottey, S., Erfan, J., Zabolotnyy, D., Kienzer, H.-R., Cupissol, D., et al. (2008). Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N. Engl. J. Med.* 359, 1116–1127.
- Vidarsson, G., Dekkers, G., and Rispen, T. (2014). IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front. Immunol.* 5, 520.
- Vidarte, L., Pastor, C., Mas, S., Blázquez, A.B., de los Rios, V., Guerrero, R., and Vivanco, F. (2001). Serine 132 is the C3 covalent attachment point on the CH1 domain of human IgG1. *J. Biol. Chem.* 276, 38217–38223.
- Vlaicu, S.I., Tegla, C.A., Cudrici, C.D., Danoff, J., Madani, H., Sugarman, A., Niculescu, F., Mircea, P.A., Rus, V., and Rus, H. (2013). Role of C5b-9 complement complex and response gene to complement-32 (RGC-32) in cancer. *Immunol. Res.* 56, 109–121.
- Wallis, R., Mitchell, D.A., Schmid, R., Schwaeble, W.J., and Keeble, A.H. (2010). Paths reunited: Initiation of the classical and lectin pathways of complement activation. *Immunobiology* 215, 1–11.
- Wiesmann, C., Katschke, K.J., Yin, J., Helmy, K.Y., Steffek, M., Fairbrother, W.J., McCallum, S.A., Embuscado, L., DeForge, L., Hass, P.E., et al. (2006). Structure of C3b in complex with CRiG gives insights into regulation of complement activation. *Nature* 444, 217–220.
- Wu, J., Lei, L., Wang, S., Gu, D., and Zhang, J. (2012). Immunohistochemical expression and prognostic value of CD97 and its ligand CD55 in primary gallbladder carcinoma. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012, 587672.
- Yan, J., Allendorf, D.J., Li, B., Yan, R., Hansen, R., and Donev, R. (2008). The role of membrane complement regulatory proteins in cancer immunotherapy. *Adv. Exp. Med. Biol.* 632, 159–174.
- Yang, X., Zhang, X., Mortenson, E.D., Radkevich-Brown, O., Wang, Y., and Fu, Y.-X. (2013). Cetuximab-mediated tumor regression depends on innate and adaptive immune responses. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 21, 91–100.

Abkürzungsverzeichnis

Zipfel, P.F., and Skerka, C. (2009). Complement regulators and inhibitory proteins. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 729–740.

(2006). Cetuximab approved by FDA for treatment of head and neck squamous cell cancer. *Cancer Biol. Ther.* 5, 340–342.

9 Anhang

9.1 Material

9.1.1 Chemikalien und Puffer

Tabelle 19. Chemikalien und Puffer

Bezeichnung	Hersteller
β-Mercapto-Ethanol	Carl ROTH, Karlsruhe, D
Agar Agar (Seakam®)	Lonza Group Ltd., CH
Ampizillin	Carl ROTH, Karlsruhe, D
Aqua dest.	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Accutase	GE Healthcare, Solingen, D
Albumin Fraktion V, proteasefrei BSA	Carl ROTH, Karlsruhe, D
Calzium Chlorid Dihydrat	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
⁵¹Chrom	Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig, D
Dulbecco's Modified Eagle Medium	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Sialine (1x/ 10x)	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Dimethyl Sulfoxide USP Grade	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Smart Ladder	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Dialysiertes FCS	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Easycoll Seperating Solution	Biochrom AG, Berlin, D
Ethidium-Bromid	Carl ROTH, Karlsruhe, D
Ethanol vergällt, ca 99%	BÜFA Chemikalien, Hude, D
FCS	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Genitacin 50 mg/ml	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Hank's Balanced Salt Solution (1x)	PAA Laboratories, Pasching, D
Isopropanol (2-Propanol)	Carl ROTH, Karlsruhe, D
Lepirudin (Refludan®)	Celgene, München, D
Magermilchpulver	Carl ROTH, Karlsruhe, D
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Carl ROTH, Karlsruhe, D
MEM NEAA 100x	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Methionin Sulfoximin	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Methanol	Merck, Darmstadt, D
MOPS SDS Running Buffer (20x)	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
NatriumAzid	Merck, Darmstadt, D
Optiphase Supermix	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
Paraformaldehyd	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Penicillin und Streptomycin (PenStrep)	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
RPMI-1640 Medium	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Salzsäure 25%	Carl ROTH, Karlsruhe, D
Trypsin-EDTA (0,05%)	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
TritonX 100	Merck, Darmstadt, D
Trypan Blue Solution 100ml (0,4%)	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Tween 20	Merck, Darmstadt, D
Soc Medium	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

9.1.2 Verwendete Geräte

Tabelle 20. Verwendete Geräte

Bezeichnung	Hersteller
1450 MicroBeta TriLux. LSC & Luminescence Counter	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
AF 200 Eismaschine	Scotsman Ice Systems; Vernon Hills, IL, USA
ÄKTAprime liquid chromatography system“	GE Healthcare, St Giles, UK
Durchflusszytometer (Epics/ Navios)	Beckman Coulter, Brea, CA
Experion Pro260, Bio-Rad, Hercules, CA, USA).	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Galaxy Mino Zentrifuge	VWR, Darmstadt, D
Gel Doc™ XR+ System	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Hera cell 240 Brutschrank	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Hera safe Reinluftbank	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Heraeus Multifuge 3S+ Zentrifuge	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Heraeus Megafuge 1.0R Zentrifuge	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Heraeus Multifuge 4 KR Zentrifuge	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
HeroLab Transilluminator	HeroLAB; Wiesloch D
Lichtmikroskop (Axiovert 40C/ AxioStarplus)	Zeiss, Oberkochen, D
Magnetrührer Hi-Mix S	Heidolph Instruments, Schwabach, D
NeubauerZählkammer 0,1 mm	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Königshofen, D
pH211 Microprocessor pH Meter	Hanna instruments, Woonsocket, Rhode Island, USA
Poly-Prep®-Chromatographie Tropfsäule	
PowerPack HC	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Titramax101 Orbialschüttler	Heidolph Instruments, Schwabach, D
TRANS-BLOT® SD SEMI-DRY Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Sunrise™ Plate-Reader	Tecan Group Ltd, Männerdorf ,CH
SuperDex™200 10 x 30	GE Healthcare, St Giles, UK
Syngene Gelvue GVS20	Syngene Frederick, MD, USA
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Wasserbad	Memmert, Schwabach, D
XB 120a Waage	Precisa Gravimetrics, Dietikon, CH
XB 2200C Waage	Precisa Gravimetrics, Dietikon, CH
Wide Mini-Sub® Cell GT Agarosegelkammer	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA

9.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 21. Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
6-, 12-, 96-well Platte (flacher und runder Boden)	Sarstedt, Nürnberg, D
96well Platte (v-förmiger Boden)	Anicrin, Scorze, I
BD Falcon Cell Strainer (70 µl Nylon)	BD Biosciences, Bedford, MA, USA
Citrat-Röhrchen	Sarstedt, Nürnberg, D
Combitips advanced 2,5 ml (steril/ unsteril)	Eppendorf, Hamburg, D
Express™Plus-Systems	Merck, Darmstadt, D
FACS-Röhrchen (5ml)	Sarstedt, Nürnberg, D
Falcons (15 ml/ 50 ml)	Sarstedt, Nürnberg, D
Immuno Module (ELISA-Streifen)	Nunc, Roskilde, DK
Micro-Schraubröhrchen (2 ml/ 1,5 ml)	Sarstedt, Nürnberg, D
Parafilm Verschlussfolie	Th. Geyer, Renningen, D
Poly-Prep® Chromatography colums	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Reagent Reservoir (50 ml)	VWR International, West Chester, PA, USA
Safe Seal micro tube (2 ml/ 1,5 ml)	Sarstedt, Nürnberg, D
Safety-Multifly-Set	Sarstedt, Nürnberg, D
Serologische Pipetten (2/ 10/ 25/ 50 ml, steril)	Sarstedt, Nürnberg, D
Serum-Röhrchen	Sarstedt, Nürnberg, D
Slid-A-Lyzer Dialysis cassettes 10,000 MWCO,	Pierce Biotechnology, Waltham, MS, USA
Sterile Spatel	VWR International, West Chester, PA, USA
Top-Seal A	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
VIVASPIN 6 10,000 MWCO PES	Sartorius GmbH, Göttingen, D
Zellkulturflaschen mit Filter	Greiner, Frickenhausen, D
Zellkulturschalen	Sarstedt, Nürnberg, D

9.1.4 Verwendete und generierte Vektoren

Tabelle 22. Verwendete und generierte Vektoren

Name	Vektor	Insert
pEE14.4-225-VL-κ	pEE14.4-GS	225-VL-κ
pEE14.4-C2B8-VL-κ	pEE14.4-GS	C2B8-VL-κ
pEE14.4-225-VH-IgG1	pEE14.4-GS	225-VH-IgG1
pEE14.4-225-VH-IgG3	pEE14.4-GS	225-VH-IgG3
pEE14.4-C2B8-VH-IgG1	pEE14.4-GS	225-VH-IgG1
pEE14.4-C2B8-VH-IgG3	pEE14.4-GS	225-VH-IgG3
pCMV6-Entry	pCMV6-Entry Vektor	----
pCMV6-Entry-CD55	pCMV6-Entry Vektor	humanes CD55
pCMV6-Entry-CD59	pCMV6-Entry Vektor	humanes CD59
GFP-Vektor		Grün floureszierendes Protein

9.1.5 Verwendete Zelllinien

Tabelle 23. Verwendete Zelllinien

Bezeichnung	Herkunft	Beschreibung	Bezugsquelle
A1207	human	Glioblastom	Dr. Aaronson, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA
A431	human	Plattenepithelkarzinom der Vulva	DSMZ, Braunschweig, D
DiFi	human	Kolorektales Adenokarzinom	M. D. Anderson Cancer Center, University of Texas, TX, USA
BHK-21	Hamster	Fibroblastenzelllinie der Niere	DSMZ, Braunschweig, D
BHK-21-EGFR⁺	Hamster	Fibroblastenzelllinie der Niere, stabil transfiziert mit humanem EGFR	Derer et al. 2012
CHO-K1	Hamster	Ovarialkarzinom	Lonza Group Ltd., CH
CHO-K1-anti-EGFR-IgG1	Hamster	Ovarialkarzinom, stabil transfiziert mit anti-EGFR-IgG1	Rösner et al. 2014
CHO-K1-anti-EGFR-IgG3	Hamster	Ovarialkarzinom, stabil transfiziert mit anti-EGFR-IgG3	Rösner et al. 2014
CHO-K1-ktrl-IgG1	Hamster	Ovarialkarzinom, stabil transfiziert mit ktrl-IgG1	Rösner et al. 2014
CHO-K1-ktrl-IgG3	Hamster	Ovarialkarzinom, stabil transfiziert mit ktrl-IgG3	Rösner et al. 2014

9.1.6 Verwendete Software

Tabelle 24. Verwendete Software

Bezeichnung	Hersteller
1450 MicroBeta Workstation Software	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
CXP Analysis	Beckmann Coulter, Krefeld, D
Dsiccovery Studio 4.0	Accelrys, San Diego, CA, USA
Microsoft Office 2010	Microsoft, Redmond, WA, USA
Kaluza	Beckmann Coulter, Krefeld, D
Prism 4.0 und 5.0	Graphpad Software, La Jolla, CA, USA
Unicorn 5.01	GE Healthcare, St Giles, UK
Zotero	Center for History and New Media, George Mason University, USA

9.1.7 Verwendete Kits und Reagenzien

Tabelle 25. Kits und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
HF- <i>Bam</i> HI Restriktionsenzym	New England Biolabs, Ipswich, MS, USA
Capture Select Fab anti-human k-L chain chromatography matrices	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
CellTiter96 AQ non-radioactive Cell Proliferation assay	Promega, Mannheim, D
Coomassie Brilliant Blue Safe Stain	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
HF- <i>Eco</i> RI Restriktionsenzym	New England Biolabs, Ipswich, MS, USA
HF- <i>Hind</i> III Restriktionsenzym	New England Biolabs, Ipswich, MS, USA
Human Anaphylatoxin Kit	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Humanes C1q-depletiereteserum	Complement Technologies, Tyler, TX, USA
Humanes C1q-Protein	Complement Technologies, Tyler, TX, USA
Humanes Factor B-depletieretes Serum	Complement Technologies, Tyler, TX, USA
Humanes Factor B-Protein	Complement Technologies, Tyler, TX, USA
Ligase	New England Biolabs, Ipswich, MS, USA
Lipofectamine 2000	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
HF- <i>Not</i> I Restriktionsenzym	New England Biolabs, Ipswich, MS, USA
Nucleobond XTRA Maxi	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, D
NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris Gels	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Precision Plus Protein™ Dual Color Standard	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
QIAquick Gelextraction Kit	Quiagen, Velo, NL
QIAprep Spin Miniprep Kit	Quiagen, Venlo, NL
QiFikit	DAKO, Glostrup, DK
Sigma Fast™ OPD Tablet	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

9.1.8 Verwendete Primer

Tabelle 26. Verwendete Primer

Primer	Sequenz [5' → 3']	Schmelzpunkt [°C]
Fw_IgG_1	TGAATCACAAGCCCAGCAACA	52,4
Fw_IgG_2	CACCCCAAAGGCCAAACTCTC	56,3
Fw_IgG_5	CTGAACGGCAAGGAGTACAAG	54,4
Fw_IgG_6	AGCAAGCTCACCGTGGACAAG	56,3
Fw_225_VH_out	CTGTGCCAGAGCCCTCACCTA	58,3
Rev_IgG_1	CTCCTGCCCTGGACGCATCCC	60
Rev_IgG_2	TGGTACGTGGACGGCGTGGA	57,9
Fw_IgG3R435H_Fc	TTCACCAAGGGCCCATCG	52,6
Rev_IgG3R435H_Fc	CTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA	56,7
Fw pEE14.4 seq	CAGACTAACAGACTGTTTCCT	49,7
Rev pEE14.4 hu kappa seq	GTCATCATCAGATGGCGGCGGG	62,4

9.1.9 Verwendete siRNA in der *mCRP*-Herunterregulierung

Tabelle 27. Verwendete siRNA in der *mCRP*-Herunterregulierung

CD46	Sense Strang	Antisense Strang
siRNA #1 (IDHSS142895)	5'-CAUGUCCAUAUAUACGGGAUCCUUU-3'	5'-AAAGGAUCCCGUAUAUAUGGACAUG-3'
siRNA #2 (ID HSS181049)	5'-GGUGAACGAGUAGAUUAUAAGUGUA-3'	5'-UACACUUAUAAUCUACUCGUUCACC-3'
siRNA #3 (ID HSS181050)	5'-CAAAUGGGACUUAGGAGUUUGGUUA-3'	5'-UAACCAAACUCGUAAGUCCCAUUUG-3'
CD55	Sense Strang	Antisense Strang
siRNA #1 (ID HSS102621)	5'-ACAGUCUGUAACGUAUGCAUGUAAU-3'	5'-AUUACAUGCAUACGUUACAGACUGU-3'
siRNA #2 (ID HSS175910)	5'-CACAGUAAAUGUCCAACUACAGAA-3'	5'-UUCUGUAGUUGGAACAUUUACUGUG-3'
siRNA #3 (ID HSS175911)	5'-GGGUACAAAUAUUUGGCUCGACUU-3'	5'-AAGUCGAGCCAAAUAUUUGAACCA-3'
CD59	Sense Strang	Antisense Strang
siRNA #1 (ID HSS101611)	5'-CCAAAGCUGGGUAUCAAGUGUAUAA-3'	5'-UUAUACACUUGUAACCCAGCUUUGG-3'
siRNA #2 (ID HSS10613)	5'-AGUUCUUCUGCUGGUGACUCCAUUU-3'	5'-AAAUGGAGUCACCAGCAGAAGAACU-3'
siRNA #3 (ID HSS10613)	5'-AGUUCUUCUGCUGGUGACUCCAUUU-3'	5'-AAAUGGAGUCACCAGCAGAAGAACU-3'

9.1.10 Zusammensetzung der verwendeten Puffer

Tabelle 28. Zusammensetzung der verwendeten Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
1x TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat + 1 mM EDTA
1x TBS-Puffer	7,7 mM Tris-HCL + 150 mM NaCl, pH = 7,5
Anti-humane-Kappa-Leichtketten Affinitätschromatographie Elutionspuffer	0,1 M Glycin, pH = 3
Anti-humane-Kappa-Leichtketten Affinitätschromatographie Neutralisierungspuffer	1 M Tris, pH = 8,9
Elisa-Blockingt-Puffer	1 x PBS + 0,1 % w/v BSA + 0,05 % v/v TWEEN20
ELISA Stopp-Lösung	10 % (v/v) HCl
Elisa-Wasch-Puffer	1 x PBS + 0,05 % v/v TWEEN20
FACS Puffer	1x PBS + 1% (w/v) BSA + 0,1 % (v/v) Natriumazid
Western Blot Blocking-Puffer	1x-TBS + 5 % (w/v) Magermilchpulver
Western Blot Transfer-Puffer	25 mM Tris HCl+ 192 mM Glycin + 20 % (v/v) Methanol, pH =n 8,3
Western Blot Wasch-Puffer	1x-TBS + 0,2 % (v/v) TWEEN 20

9.1.11 Primäre monoklonale Antikörper

Tabelle 29. Primäre monoklonale Antikörper

Bezeichnung	Ursprung	Beschreibung	Antigen	Bezugsquelle
anti-EGFR-IgG1	Chimär	Variable Region: 225	EGFR	Rösner et al. 2014
anti-EGFR-IgG3	Chimär	Variable Region: 225	EGFR	Rösner et al. 2014
ktrl-IgG1	Chimär	Variable Region: 2B8	CD20	Rösner et al. 2014
ktrl-IgG3	Chimär	Variable Region: 2B8	CD20	Rösner et al. 2014
003-IgG1	Human	Variable Region: 003	EGFR	Genmab, Utrecht, NL
m425-IgG2b	Murin	Variable Region: 425	EGFR	Hybridom
CRlg-Fc (CRlg/Fc-Part- Fusionsprotein	Human	Variable Region: CRlg	C3b	Genentech, San Francisco, CA, USA,
846-IgG2b	Murin	Variable Region: 846	CD46	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
S031-IgG2b	Murin	Variable Region: S031	CD55	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
BRIC219-IgG2a	Murin	Variable Region: BRIC219	CD55	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
mem43-IgG2b	Murin	Variable Region: mem43	CD59	DAKO, Glostrup, DK

9.1.12 Sekundäre Antikörper

Tabelle 30. Sekundäre Antikörper

Bezeichnung	Klonalität	Antigen	Bezugsquelle
Hase anti-humanes C1q/FITC	polyklonal	C1q	DAKO, Glostrup, DK
Hase anti-humanes C4c/FITC	polyklonal	C4c	DAKO, Glostrup, DK
Maus anti-humanes C3b	monoklonal	C3b	QUIDEL, San Diego, CA
Maus anti-humanes Faktor Bb	monoklona	Faktor Bb	QUIDEL, San Diego, CA
Maus anti-humanes C5b-9	monoklonal	C5b-9	QUIDEL, San Diego, CA
Ziege anti-Maus Fcγ -spezifisches F(ab)₂/FITC	polyklonal	Maus Fcγ	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA
Maus anti-humanes CD46/PB	polyklonal	CD46	Exbio, Praha, CZ
Maus anti-humanes CD55/PE	polyklonal	CD55	Beckman Coulter, Brea, CA,
Maus anti-humanes CD59/FITC	polyklonal	CD59	Exbio, Praha, CZ
Maus Isotypkontrolle /PB	polyklonal	-----	Exbio, Praha, CZ
Maus Isotypkontrolle /PE	polyklonal	-----	Exbio, Praha, CZ
Maus Isotypkontrolle /FITC	polyklonal	-----	Exbio, Praha, CZ
Ziege anti-humanes IgG (H+L) /HRP	polyklonal	IgG	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Ziege anti-humanes IgG/HRP	polyklonal	IgG	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Zieges anti-humanes Kappa /HRP	polyklonal	Kappa	BIOZOL GmbH, Eching, D
Zieges anti-humanes Kappa /FITC	polyklonal		AVIVA Systems Biology, San Diego, CA, USA
Zieges anti-humanes Kappa	polyklonal	Kappa	Abcam, Cambridge, UK

9.2 Komplement-Depositionsexperimente: Dotplots und Histogramme

9.2.1 Anlagerung von der Komplementkomponente C1q

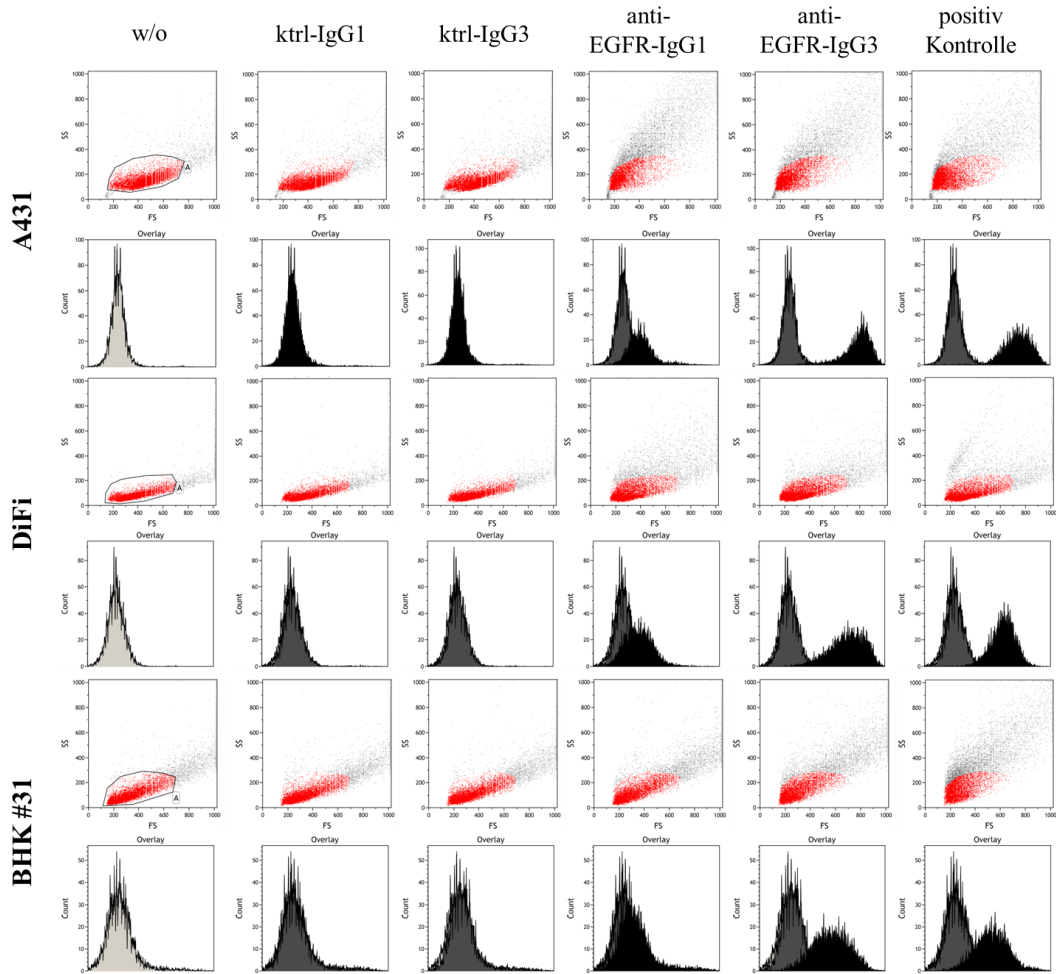


Abbildung 53. Exemplarische Darstellung der Punktdiagramme und Histogramme der C1q-Anlagerung. Dargestellt sind die Ergebnisse für die jeweilig verwendeten Zelllinien (A431, DiFi und BHK-EGFR⁺ #5) und Antikörper (w/o, ktrl-IgG1, ktrl-IGG3, anti-EGFR-IgG1, anti-EGFR-IgG3 und die Positivkontrolle). In rot sind die jeweiligen Analysefenster markiert.

9.2.2 Anlagerung von der Komplementkomponente C4b

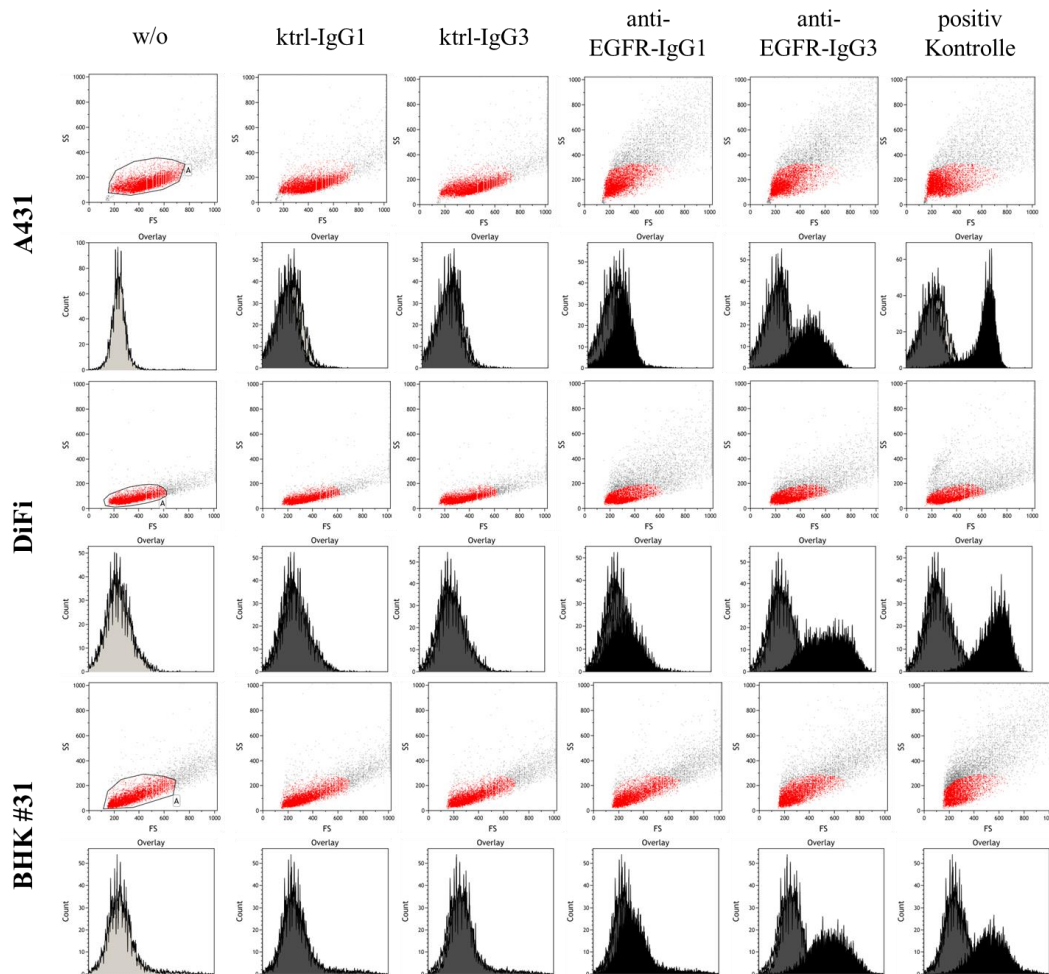


Abbildung 54. Exemplarische Darstellung der Punktdiagramme und Histogramme der C4b-Anlagerung. Dargestellt sind die Ergebnisse für die jeweilig verwendeten Zelllinien (A431, DiFi und BHK-EGFR⁺ #5) und Antikörper (w/o, ktrl-IgG1, ktrl-IGG3, anti-EGFR-IgG1, anti-EGFR-IgG3 und die Positivkontrolle). In rot sind die jeweiligen Analysefenster markiert.

9.2.3 Anlagerung von der Komplementkomponente C3b

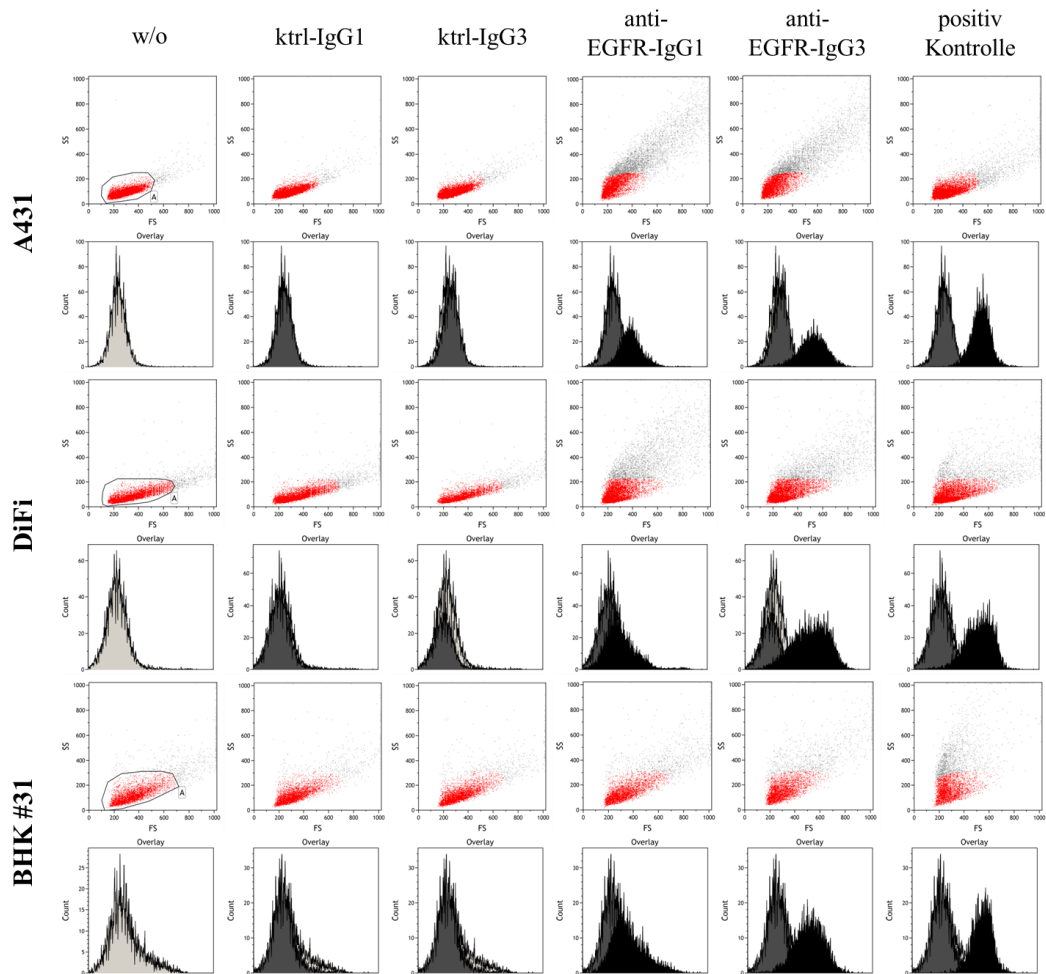


Abbildung 55. Exemplarische Darstellung der Punktdiagramme und Histogramme der C3b-Anlagerung. Dargestellt sind die Ergebnisse für die jeweilig verwendeten Zelllinien (A431, DiFi und BHK-EGFR⁺ #5) und Antikörper (w/o, ktrl-IgG1, ktrl-IGG3, anti-EGFR-IgG1, anti-EGFR-IgG3 und die Positivkontrolle). In rot sind die jeweiligen Analysefenster markiert.

9.2.4 Anlagerung von der Komplementkomponente Faktor Bb

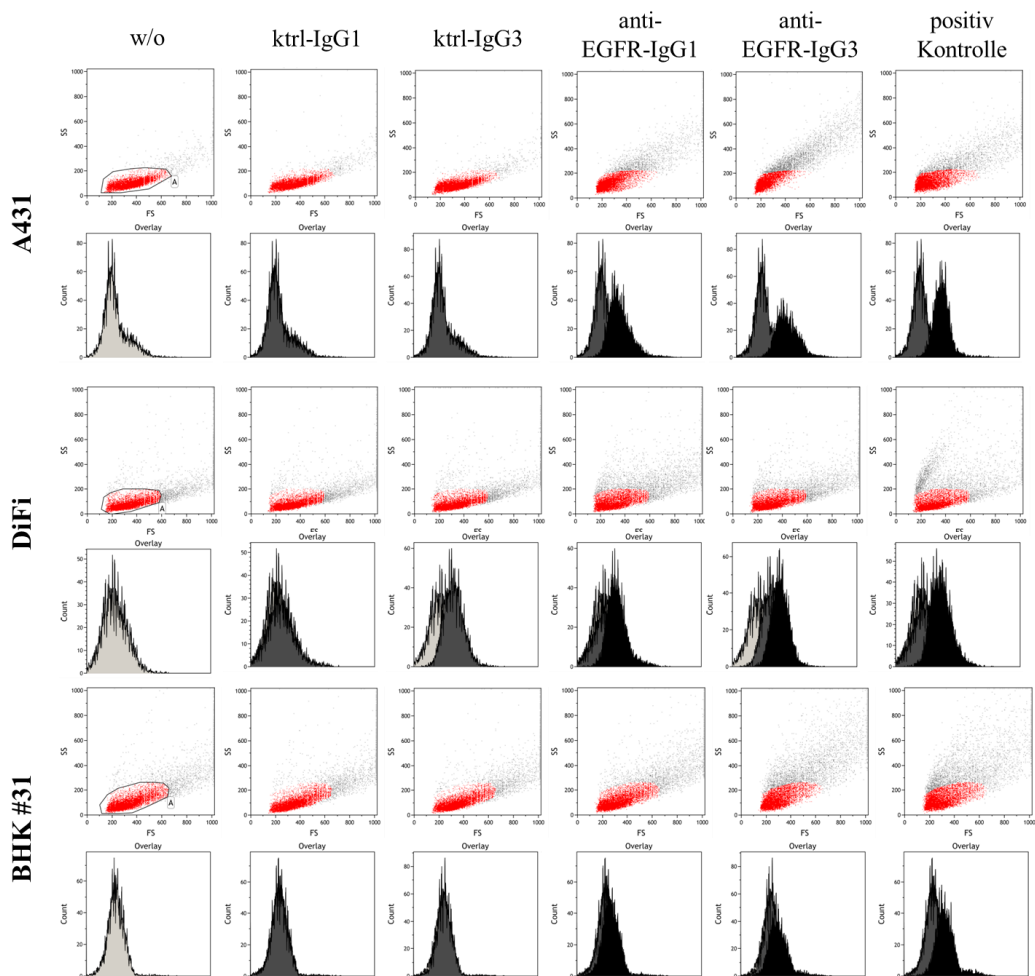


Abbildung 56. Exemplarische Darstellung der Punktdiagramme und Histogramme der Faktor Bb- Anlagerung. Dargestellt sind die Ergebnisse für die jeweilig verwendeten Zelllinien (A431, DiFi und BHK-EGFR⁺ #5) und Antikörper (w/o, ktrl-IgG1, ktrl-IGG3, anti-EGFR-IgG1, anti-EGFR-IgG3 und die Positivkontrolle). In rot sind die jeweiligen Analysefenster markiert.

9.2.5 Anlagerung von der Komplementkomponente C5b-9

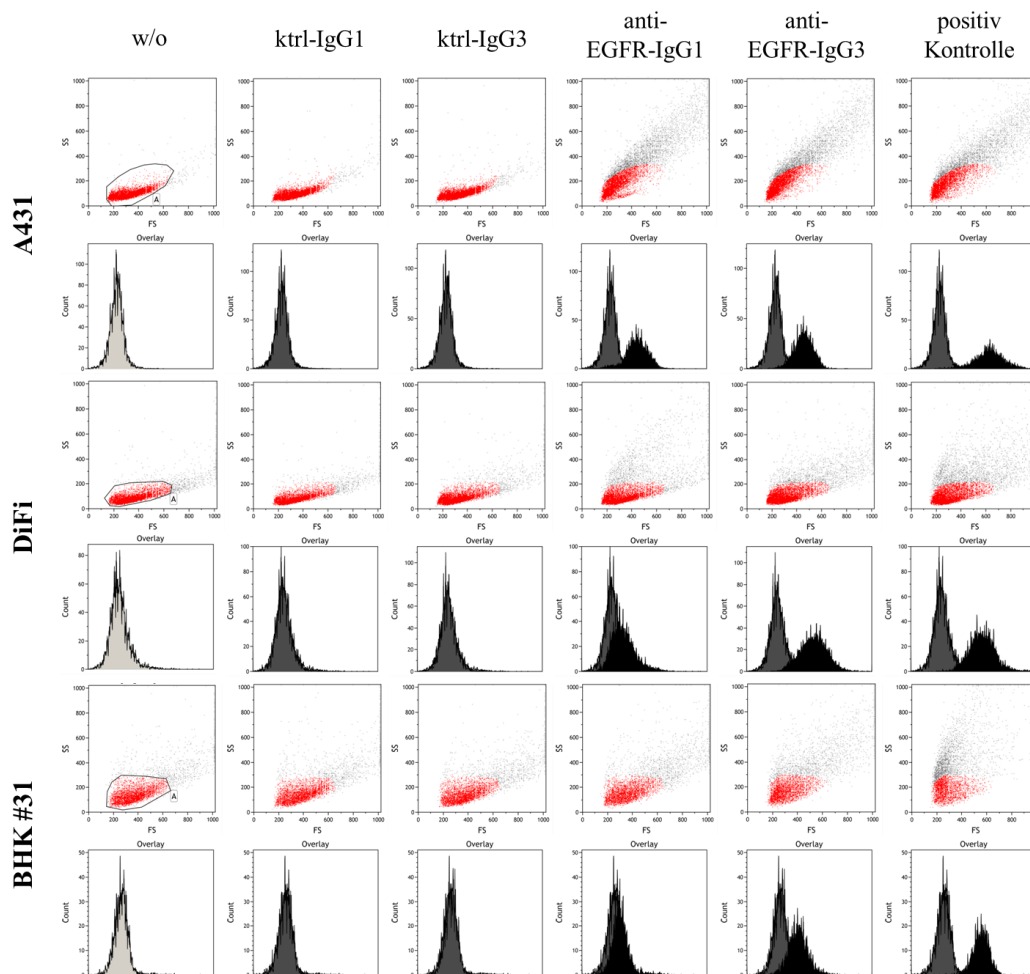


Abbildung 57. Exemplarische Darstellung der Punktdiagramme und Histogramme der C5b-9- Anlagerung. Dargestellt sind die Ergebnisse für die jeweilig verwendeten Zelllinien (A431, DiFi und BHK-EGFR⁺ #5) und Antikörper (w/o, ktrl-IgG1, ktrl-IgG3, anti-EGFR-IgG1, anti-EGFR-IgG3 und die Positivkontrolle). In rot sind die jeweiligen Analysefenster markiert.

9.3 Sequenzierungsdaten

9.3.1 pEE 14.4.225-VL-Kappa

```

5´ AAGCTTGGGATCCAATGGCATGCCCTGGCTTCCTGTGGGCACTTGTGATCTCCACCTGTCTTGAATTTTCCATGGCCGACA
TTCTGATGACCCAGTCTCCAGTCATCCTGTCTGTGAGTCCAGGAGAAAGAGTCAGTTTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATT
GGCACAAACATACACTGGTATCAGCAAAGAACAATGGTTCTCCAAGGCTTCTCATAAAGTATGCTTCTGAGTCTATCTCTGG
GATCCCTTCCAGGTTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACTCTTAGCATCAACAGTGTGGAGTCTGAAGATATTGCAG
ATTATTACTGTCAACAAAATAATAACTGGCCAACCACGTTCCGGTGTGGGACCAAGCTGGAAATAAAACGTAAGTAGTCTTCT
CAAGCGGCCCTAGGAAGAACTCAAAACATCAAGATTTAAATACGCTTCTTGGTCTCCTTGTATAATTATCTGGGATAAG
CATGCTGTTTTCTGTCTGTCCCTAACATGCCCTGTGATTATCCGCAAACAACACACCCAAGGGCAGAACTTTGTTACTTAAAC
ACCATCTGTTTGTCTTCTTCTCAGGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAAT
CTGGAAGTGCCTCTGTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGTGGATAACGCCCTC
CAATCGGGTAAGTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAG
CAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCA
ACAGGGGAGAGTGTTAGAGGTACCCGGGCACGTGCGGACCCGAATTC-3´

```

Abbildung. 58. Sequenzausschnitt der Sequenzierungsdaten von pEE-14.4-225-VL-Kappa. Dargestellt ist ein Sequenzausschnitt von 5´- nach 3´- der Sequenzierung. Mit Unterstrich versehen sind die Restriktionsschnittstellen. In grau dargestellt sind Startkodon (ATG) und Stoppkodon (TAG). Kursiv ist das Intron zwischen variabler und konstanter Domäne. In gelb ist variable Domäne, in grün die konstante Domäne gekennzeichnet.

9.3.2 pEE 14.4.225-VH-IgG1-wt

```

5´ AAGCTTTCGCGACGTACGTTTCGAACCCGATCCAATGGCATGCCCTGGCTTCCTGTGGGCACTTGTGATCTCCACCTGTCTTG
AAATTTCCATGGCCGAGGTGCAGCTGGAGGAGTCAAGGACCTGGCCTAGTGCAGCCCTCACAGAGCCTGTCCATCACCTGCACA
GTCTCTGGTTTTCTCATTAACATAACTATGGTGTACACTGGGTTCGCCAGTCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTGAT
ATGGAGTGGTGGAAACACAGACTATAATACACCTTTACATCCAGACTGAGCATCAACAAGGACAATTCGAAGAGCCAAGTTT
TCTTTAAATGAACAGTCTGCAATCTAATGACACAGCCATATATTACTGTGCCAGAGCCCTCACCTACTATGATTACGAGTTT
GCTTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCGACAGGTGAGTGGCGCGCTCTGTGCTGGGTTCTCCAGTATAGAGGA
GAGGCAGGCACAGACTGTCTCTGGGACATGGCATGAGGGCCGCTCTCACAGTGCATTCTGTGTCCAGCCTCCACCAA
GGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACT
ACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAAGTCAAGGACCTGACCGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCC
TCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCCTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCA
CAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACACACATGCCACCGTGCACAGCAC
CTGAAGTCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAAAACCCAAAGGATACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC
ACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGC
CAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGA
ATGGCAAGGAGTACAAGTCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAG
CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAA
AGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGC
TGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGTCAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGC
TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGAGAAGAGCCTTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGAATTC-3´

```

Abbildung 59. Sequenzausschnitt der Sequenzierungsdaten von pEE-14.4-225-VL-Kappa. Dargestellt ist ein Sequenzausschnitt von 5´- nach 3´- der Sequenzierung. Mit Unterstrich versehen sind die Restriktionsschnittstellen. In grau dargestellt sind Startkodon (ATG) und Stoppkodon (TAG). Kursiv ist das Intron zwischen variabler und konstanter Domäne. In gelb ist variable Domäne, in grün die konstante Domäne gekennzeichnet.

9.3.3 pEE 14.4.225-VH-IgG3-R435H

```

5' AAGCTTCGCGACGTACGTTCGAACCCGATCCAATGGCATGCCCTGGCTTCTCTGTGGGCACTTGTGATCTCCACCTGTCTTG
AATTTTCCATGGCCGAGGTGCAGCTGGAGGAGTCAGGACCTGGCCTAGTGCAGCCCTCACAGAGCCCTGTCCATCACCTGCACA
GTCTCTGGTTTCTCATTAACCTAATGTTGTACACTGGGTTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTGAT
ATGGAGTGGTGGAAACACAGACTATAATACACCTTTCACATCCAGACTGAGCATCAACAAGGACAATTTCAAGAGCCAAGTTT
TCTTTAAAATGAACAGTCTGCAATCTAATGACACAGCCATATATTACTGTGCCAGAGCCCTCACCTACTATGATTACGAGTTT
GCTTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCGACAGGTGAGTGGGCGCTCTGTGCTGGGTTCCTCCAGTATAGAGGA
GAGGACGGCACAGACTGTCTCTGGGGACATGGCATGAGGGCCGCTCTCACAGTGCATTTCTGTGTTCCAGCTTCCACCAA
GGGCCATCGGTCTTCCCGCTGGCGCCTGCTCCAGGAGCACCTCTGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACT
ACTTCCCGAACCCTGACGGTGTCTGTGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGTGTCTTACAGTCC
TCAGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTGAATCA
CAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCTCAAAAACCCACTTGGTGACACAACCTCACACATGCCACGGTGCC
CAGAGCCCAAATCTTGTGACACACCTCCCCCGTGCCACGGTGCCAGAGCCCAAATCTTGTGACACACCTCCCCATGCCCA
CGGTGCCAGAGCCCAAATCTTGTGACACACCTCCCCCGTGCCAAGGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGAGGACCGTCAGT
CTTCTCTTCCCCCAAACCCAAAGGATACCCTTATGATTCCCCGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC
ACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAGTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGGGGAGGAGCAG
TACAACAGCACGTTCCTGTGGTACAGCTCCTCACCCTCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGT
CTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAGGACAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACC
TGCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGACCGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCC
GTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACAACACCACGCTCCATGTGGACTCCGACGGCTCTTCTTCTCT
CTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACATCTTCTCATGTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA
ACCGCTTACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATGAATTC-3'

```

Abbildung 60. Sequenzausschnitt der Sequenzierungsdaten von pEE-14.4-225-VL-Kappa.
 Dargestellt ist ein Sequenzausschnitt von 5'- nach 3'- der Sequenzierung. Mit Unterstrich versehen sind die Restriktionsschnittstellen. In grau dargestellt sind Startkodon (ATG) und Stoppkodon (TAG). Kursiv ist das Intron zwischen variabler und konstanter Domäne. In gelb ist variable Domäne, in grün die konstante Domäne gekennzeichnet.

9.3.4 pEE 14.4.c2b8-VL-Kappa

```

5' AAGCTTCGCGAGCCACCATGGAGACAGACACACTCTGCTATGGGTAAGTCTGCTGCTGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGATA
TCGTCTCAGCCAGTCTCCAGCCATCCTCTCCGCATCTCCTGGCGAGAAAGGTGACCATGACCTGCAGAGCTTCCAGCTCCGTC
AGCTACATCCACTGGTTCCAGCAGAAGCCTGGAAGCAGCCCAAAGCCCTGGATCTACGCCACCAGCAACCTGGCTAGCGGAGT
CCCAGTGAGGTTCTCAGGGAGCGGAAGTGGCACCTCTACAGCCTGACCATCAGCAGGGTGGAGGCTGAAGATGCAGCCACCT
ACTACTGCCAGCAGTGGACCTCCAATCCTCCACCTTTGGTGGAGGAACCAAACTGGAGATCAAA TTAGTGGCAGTGGATCAG
GGACAGATTTTACTCTTAGCATCAACAGTGTGGAGTCTGAAGATATTGCAGATTATTACTGTCAACAAAATAATAACTGGCCA
ACCACGTTCCGTGCTGGGACCAAGCTGGAATAAAAACGTAAGTAGTCTTCTCAAGCGGCCGTAGGAAGAACTCAAAAACATC
AAGATTTAAATACGCTTCTTGGTCTCCTTGCTATAATTATCTGGGATAAGCATGCTGTTTTCTGTCTGTCCCTAACATGCC
TGTGATTATCCGCAACAACACACCCAAAGGGCAGAACTTTGTTACTTAAACACCATCCTGTTGCTTCTTCTCAGGAACTG
TGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAAT
AACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAAGTCCAGGAGAGTGTACAGA
GCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACAAAAGTCTACG
CCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAGAGGTACCCGGGCAGC
TGCCGACCGAATTC-3'

```

Abbildung 61. Sequenzausschnitt der Sequenzierungsdaten von pEE-14.4-225-VL-Kappa.
 Dargestellt ist ein Sequenzausschnitt von 5'- nach 3'- der Sequenzierung. Mit Unterstrich versehen sind die Restriktionsschnittstellen. In grau dargestellt sind Startkodon (ATG) und Stoppkodon (TAG). Kursiv ist das Intron zwischen variabler und konstanter Domäne. In gelb ist variable Domäne, in grün die konstante Domäne gekennzeichnet.

9.3.5 pEE 14.4.c2b8-VH-IgG1-wt

```

5' AAGCTTCGCGAGCCACCATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCAGGTTCCACTGGTGACG
AGGTCAGCTGCAGCAGCCTGGAGCCGAGTTGGTGAAGCCAGGCGCCAGCGTCAAAATGAGCTGCAAAGCCTCAGGCTACACC
TTCACCAGCTACAACATGCACTGGGTGAAGCAGACACCAGGACGAGGACTGGAGTGGATCGGCGCTATCTACCCTGGCAACGG
AGACACCTCCTACAACCAGAAGTTCAAGGGGAAGGCAACACTGACCGCTGACAAGTCCAGCAGCACAGCCTACATGCAGCTGA
GCTCCCTGACTTCCGAGGATAGCGCTGTGTACTACTGCGCAAGGTCCACCTACTACGGAGGCGACTGGTACTTCAACGTGTGG
GGCGCCGGAACCACCGTCACCGTCTCGACA GGTGAGTGC GGCCGCTCTGTGCTGGGTTCCTCCAGTATAGAGGAGAGGCAGGC
ACAGACTGTCTCTGGGGACATGGCATGAGGGCCGCGTCTCACAGTGCATTCTGTGTCCA GCCTCCACCAAGGGCCCATC
GGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCG
AACCGGTGACGGTGTGTTGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGCTGTCTACAGTCTCAGGACTC
TACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCCTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAG
CAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCC
TGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCTCCCCCAAACCAAGGATACCCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGGTG
GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAA
GCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCCTGTGGTCAGCGTCTCACCCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGG
AGTACAAGTGAAGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAA
CCACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTA
TCCCAGGCATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCAGCCGAGAACTACAAGACCACGCTCCCGTGGTGGACTCCG
ACGGTCTCTTCTCTACAGCAAGTCAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATG
CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATGAGGAATTC-3'

```

Abbildung 62. Sequenzabschnitt der Sequenzierungsdaten von pEE-14.4-225-VL-Kappa.

Dargestellt ist ein Sequenzabschnitt von 5'- nach 3'- der Sequenzierung. Mit Unterstrich versehen sind die Restriktionsschnittstellen. In grau dargestellt sind Startkodon (ATG) und Stoppkodon (TAG). Kursiv ist das Intron zwischen variabler und konstanter Domäne. In gelb ist variable Domäne, in grün die konstante Domäne gekennzeichnet.

9.3.6 pEE 14.4.c2b8-VH-IgG3-R435H

```

5' AAGCTTCGCGAGCCACCATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCAGGTTCCACTGGTGACG
AGGTCAGCTGCAGCAGCCTGGAGCCGAGTTGGTGAAGCCAGGCGCCAGCGTCAAAATGAGCTGCAAAGCCTCAGGCTACACC
TTCACCAGCTACAACATGCACTGGGTGAAGCAGACACCAGGACGAGGACTGGAGTGGATCGGCGCTATCTACCCTGGCAACGG
AGACACCTCCTACAACCAGAAGTTCAAGGGGAAGGCAACACTGACCGCTGACAAGTCCAGCAGCACAGCCTACATGCAGCTGA
GCTCCCTGACTTCCGAGGATAGCGCTGTGTACTACTGCGCAAGGTCCACCTACTACGGAGGCGACTGGTACTTCAACGTGTGG
GGCGCCGGAACCACCGTCACCGTCTCGACA GGTGAGTGC GGCCGCTCTGTGCTGGGTTCCTCCAGTATAGAGGAGAGGCAGGC
ACAGACTGTCTCTGGGGACATGGCATGAGGGCCGCGTCTCACAGTGCATTCTGTGTCCA GCCTCCACCAAGGGCCCATC
GGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCG
AACCGGTGACGGTGTGTTGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGCTGTCTACAGTCTCAGGACTC
TACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCCTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTGAATCACAAGCCAG
CAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCAAAACCCCACTTGGTACACAACCTCACACATGCCACCGGTGCCAGAGCCCA
AATCTGTGACACACCTCCCCCGTGCCACGGTGCCAGAGCCCAAATCTTGTGACACACCTCCCCATGCCACGGTGCCCA
GAGCCCAAATCTTGTGACACACCTCCCCCGTGCCAAGGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGAGGACCGTCAGTCTTCTCTT
CCCCCAAACCAAGGATACCTTATGATTCCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACC
CCGAGGTCCAGTTCAGTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGC
ACGTCCCGTGTGGTACCGTCTCACCCTGCAACAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAA
AGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAACCAAGGACAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCCAT
CCCGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG
GAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACTACAACACCAGCCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCTTCTTCTCTACAGCAA
GCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACATCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCGCTTCA
CGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATGAGGAATTC-3'

```

Abbildung 63. Sequenzabschnitt der Sequenzierungsdaten von pEE-14.4-225-VL-Kappa.

Dargestellt ist ein Sequenzabschnitt von 5'- nach 3'- der Sequenzierung. Mit Unterstrich versehen sind die Restriktionsschnittstellen. In grau dargestellt sind Startkodon (ATG) und Stoppkodon (TAG). Kursiv ist das Intron zwischen variabler und konstanter Domäne. In gelb ist variable Domäne, in grün die konstante Domäne gekennzeichnet.

10 Abkürzungsverzeichnis

A Ampere

α alpha

Abb Abbildung

ADCC antibody dependent cellular cytotoxicity

aHUS Atypical hemolytic uremic syndrome

AK Antikörper

AP alternative pathway of the complement system

ATP Adenosintriphosphat

ATCC American Type Culture Collection

BHK Baby Hamster Kidney

BSA Bovines Serumalbumin

C4bP C4-bindendes Protein

Ca Calcium

CDC complement dependent cytotoxicity

CDCC complement dependent cellular cytotoxicity

cDNA complementary DNA

CH konstante schwere Kette

CHO Chinesische Hamsterovarien

CL variable schwere Kette

CO₂ Kohlenstoffdioxid

CP classical pathway of the complement system

CR3 complement receptor 3

CR1g complement receptor of the Ig-superfamily

Da Dalton

DAF decay accelerating factor

DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO Dimethylsulfoxid

DNA Desoxyribonukleinsäure

DSMZ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

EDTA Ethylendiamintetraessigsäure

EGF Epidermal Growth Factor

Abkürzungsverzeichnis

EGFR Epidermal Growth Factor Receptor
ELISA Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ErbB Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog
ERK extracellular regulated kinase
Fab Fragment antigen binding
FACS fluorescence activated cell sorting
FITC Fluoresceinisothiocyanat
Fc Fragment chrystallizable
FCS fetal calf serum
FcR Fc-Rezeptor
g Gramm
 γ gamma
GFP grün fluoreszierendes Protein
GS Glutamine Synthetase
H schwere Kette
H₂O Wasser
HER human epidermal receptor
Hinge Hinge Region oder Gelenkregion
HRP Horseradish-peroxidase
HMW High Molecular Weight
HPLC High Pressure Liquid Chromatography
Ig Immunglobulin
 κ kappa
K-Ras Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
L leichte Kette
LP lektin pathway of the complement system
M Molar
mM Millimolar
mAk monoklonaler Antikörper
MAC Membranangriffskomplex
MAP Mitogen-aktivierte-Phosphokinase
MASP MBL associated serin protease
mCRC metastatic colorectal carcinoma
mCRP membrane bound complement regulatory protein

Abkürzungsverzeichnis

MDSC myeloid-derived suppressor cells

MEM Minimum Essential Medium

MFI mittlere Fluoreszenzintensität

mg Milligramm

min Minute

ml Milliliter

mV Millivolt

µg Mikrogramm

µl Mikroliter

MTS 3-(3,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H- tetrazolium inner salt

MWCO molecular weight cut off

NaOH Natriumhydroxid

Na₂H₂PO₄ Natriumdihydrogenphosphat

NaCl Natriumchlorid

ng Nanogramm

nm Nanometer

NRG Neuregulin

Ω Ohm

PAGE Polyacrylamidgelelektrophorese

PAMP pathogen associated molecular pattern

PB Pacific blue

PBS phosphate buffered saline

PE Phycoerythrin

pH pondus Hydrogenii

PI3K Phosphoinositol-3-Kinase

POX Peroxidase

PRM pathogen recognition molecule

PRR pathogen recognition receptor

PVDF Polyvinylidenfluorid

RFI relative Fluoreszenzintensität

RNA Ribonukleinsäure

RNAi RNA interference

Rpm rounds per minute / Umdrehungen pro Minute

Abkürzungsverzeichnis

RT Raumtemperatur

SDS Sodiumdodecylsulfat

SH Src-homologe

siRNA small interfering RNA

SOC Super Optimal broth with Catabolite repression

STAT Signaltransduktoren-und-Aktivatoren-der-Transkription

SV Simian Virus

Szi Szintillation

TBS Tris buffered saline

TGF Tumor Growth Factor

TK Tyrosinkinase

TKI Tyrosinkinaseinhibitor

TLR toll-like receptor

TAE TRIS-Acetat-EDTA

U Umdrehungen

UV Ultraviolett

VEGF Vascular Endothelial Growth Factor

VL variable leichte Kette

VH variable schwere Kette

w/o without antibody / ohne Antikörper

z.B. zum Beispiel

11 Publikationen

1. Publikation:

Rösner T, Lohse S, Peipp M, Valerius T, Derer S. (2014)“Epidermal growth factor receptor targeting IgG3 triggers complement-mediated lysis of decay-accelerating factor expressing tumor cells through the alternative pathway amplification loop”; Journal of Immunology,

2. Publikation:

Rösner T, Derer S, Kellner C, Dechant M, Lohse S, Vidarsson G, Peipp M, Valerius T. (2013) “An IgG3 switch variant of rituximab mediates enhanced complement-dependent cytotoxicity against tumour cells with low CD20 expression levels”; British Journal of Haematology

3. Publikation:

Derer S, Beurskens FJ, Rosner T, Peipp M, Valerius T. (2014) “Complement in antibody-based tumor therapy”; Critical Reviews™ in Immunology

4. Publikation (Buchartikel)

Derer S, Kellner C, Rösner T, Klausz K, Glorius P, Valerius T, Peipp M. (2014) “Fc engineering of antibodies and antibody derivatives by primary sequence alteration and their functional characterization”; Methods in Molecular Biology

12 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, (Thies Rösner)

13 Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name:	Diplom-Biologe Thies Rösner
Geburtstag:	08.08.1984
Geburtsort:	Neumünster, Schleswig-Holstein, Deutschland
Wohnort:	Kiel, Schleswig-Holstein, Deutschland
Eltern:	Traugott Rösner Helga Wallis-Rösner
Geschwister	Malte Rösner
Nationalität:	Deutsch
Familienstand:	ledig

Schulischer Werdegang

1991-1995	Grund- und Hauptschule, Bordesholm
1995-2004	Alexander-von-Humboldt Schule, NMS Abschluss Abitur

Studium

2004-2011	Studium der Biologie an der Christian-Albrechts-Universität
Diplomprüfungen:	Mikrobiologie, Zellbiologie und Virologie
Diplomarbeit:	„Untersuchungen an ADP-bildenden Acyl-CoA Synthetasen“
Betreuer:	Prof. Dr. Peter Schönheit

Promotion

2011-2015 Promotion an der Christian-Albrecht-Universität
zu Kiel und dem Uniklinikum Schleswig-Holstein

Thema: „Der Einfluss von CD55 auf die Komplement-
aktivierung durch einen IgG3 Antikörper gegen
den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor“

Betreuer: Prof. Dr. Axel Scheidig (Lehrstuhl für
Strukturbiologie, CAU Kiel)
Prof. Dr. Thomas Valerius (Sektion für
Stammzelltransplantation und Immuntherapie,
UKSH Kiel)

14 Danksagung

Als erstem danke ich Herrn Prof. Dr. Thomas Valerius, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Promotion über dieses interessante Thema in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können. Des Weiteren danke ich ihm für die die Hilfe und das Korrekturlesen beim Verfassen der Publikationen, für die sehr hilfsbereite Betreuung und seinen wissenschaftlichen Rat.

Herrn Prof. Dr. Axel Scheidig danke ich für die Betreuung meiner Doktorarbeit und die hilfreiche Unterstützung.

Bei Frau Dr. Stefanie Derer bedanke ich mich für die stets gute und freundliche Betreuung in methodischen und in wissenschaftlichen Fragestellungen, sowie für die Einführung in das Thema und die experimentellen Methoden. Des Weiteren danke ich Frau Derer für die Unterstützung während des Verfassens der Publikationen.

An dieser Stelle möchte ich mich darüber hinaus bei Herrn PD. Dr. Matthias Peipp, Herrn Dr. Christian Kellner, Frau Dr. Katja Klausz und Herrn Dr. Matthias Staudinger, für ihre Geduld und Hilfsbereitschaft bei technischen und methodischen Problemen, sowie für ihren wissenschaftlichen Rat danken.

Den technischen Assistentinnen, insbesondere Frau Christyn Wildgrube und Frau Yasmin Brodman, möchte ich für die stete Hilfsbereitschaft und für die Einarbeitung in diverse Methoden danken.

Des Weiteren möchte ich meinen Mitstreiterinnen Frau Pia Glorius und Frau Anna Kretschmer für die Diskussionsbereitschaft, das freundliche Arbeitsklima und, insbesondere Frau Kretschmer für ihre die Hilfe beim Korrekturlesen dieser Arbeit danken.

Euch allen zusammen möchte ich für das sehr angenehme und freundliche Arbeitsklima danken.

Einen großen Dank möchte ich an dieser Stelle Henning und Julia und der gesamten AG Schönheit aussprechen. Dank eurer unserer Gespräche bleib ich stets ruhig und gelassen, auch wenn es mal nicht so lief.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, und meiner Freundin, welche mich immer mit allen Kräften und in allen Lagen, besonders den schwierigen, unterstützt haben und immer für mich da waren. DANKE!