

Aus dem Biochemischen Institut
(Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Stefan Rose-John)
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**ENTWICKLUNG VON STRATEGIEN ZUR DIMERISIERUNG VON
SINGLE-DOMAIN ANTIKÖRPERN (*NANOBODIES*) SOWIE ZU IHRER
PRODUKTION IN TRANSGENEN PFLANZEN
(ANHAND EINES TUMOR NEKROSE FAKTOR NEUTRALISIERENDEN
NANOBODIES)**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

INGO PLAGMANN

aus **Kiel**

Kiel 2012

1. Berichterstatter: *Prof. Dr. Stefan Rose-John*

2. Berichterstatter: *Prof. Dr. Rosenstiel*

Tag der mündlichen Prüfung: 06.11.2013

Zum Druck genehmigt, Kiel, den

gez.:

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis.....	II
2	Abkürzungsverzeichnis und Begriffserklärung.....	IX
3	Einleitung	1
3.1	Modifizierung eines Nanobodies mittels Mikrobieller Transglutaminase.....	1
3.1.1	Proteinmodifizierung und -verknüpfung.....	1
3.1.2	Mikrobielle Transglutaminase (MTG).....	3
3.1.3	<i>Single-domain</i> Antikörper (<i>Nanobodies</i>).....	4
3.1.4	Das Entzündungszytokin Tumor Nekrose Faktor	7
3.2	Erste Fragestellung	8
3.3	Pflanzenexpression eines Nanobodies mit Hilfe eines Elastin-ähnlichen Polypeptids (<i>elastin-like polypeptide</i> ; ELP).....	9
3.3.1	Heterologe Expression rekombinanter Proteine in Pflanzen.....	9
3.3.2	Elastin-ähnliche Polypeptide.....	10
3.3.3	<i>Nanobody</i> -ELP Fusionsprotein	12
3.4	Zweite Fragestellung	13
4	Material und Methoden	14
4.1	Methoden.....	14
4.1.1	Molekularbiologische Methoden.....	14
4.1.1.1	Hitzeschock Transformation	14
4.1.1.2	Plasmid-DNA-Mini-Präparation	15
4.1.1.3	Plasmid-DNA-Midi Präparation	15
4.1.1.4	Restriktionsverdau.....	15
4.1.1.5	Phenol/Chloroform-Extraktion.....	16
4.1.1.6	Ethanolpräzipitation	16
4.1.1.7	Agarose-Gelelektrophorese.....	17
4.1.1.8	Ligation	17
4.1.1.9	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	18
4.1.1.10	Sequenzierung von DNA	19
4.1.2	Klonierungsstrategien der Expressionsplasmide für <i>E. coli</i> und <i>Nicotiana tabacum</i>	19

4.1.2.1.1	Klonierung von pet23a(+)-pelB-anti-hTNF-VHH-myc-his und pet23a(+)-pelB-anti-hTNF-VHH-Stag-myc-his für Expression von ^{Ec} anti-hTNF-VHH und ^{Ec} anti-hTNF-VHH-S-tag in <i>E. coli</i>	19
4.1.2.2	Klonierung von pet23a(+)-pelB-anti-hTNF-VHH-100xELP-myc-his für Expression von ^{Ec} anti-hTNF-VHH-100xELP in <i>E. coli</i>	20
4.1.2.3	Klonierung von pCB301-Kan-35S-LeB4-anti-hTNF-VHH-myc-KDEL und pCB301-Kan-35S-LeB4-anti-hTNF-VHH-100xELP-myc-KDEL für Expression von ^{Nt} anti-hTNF-VHH und ^{Nt} anti-hTNF-VHH-100xELP in <i>Nicotiana tabacum</i>	20
4.1.3	Biochemische Methoden	21
4.1.3.1	Proteine.....	21
4.1.3.2	Berechnung der Proteinmassen	21
4.1.3.3	Umpufferung von Proteinen.....	22
4.1.3.4	Konzentrierung von Proteinen durch Ultrafiltration	22
4.1.3.5	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE).....	22
4.1.3.6	Coomassie-Färbung von Proteinen	23
4.1.3.7	Western Blotting und indirekte Immundetektion.....	23
4.1.3.8	IPTG induzierte Proteinexpression in Bakterien.....	25
4.1.3.9	Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie mit Ni-NTA Agarose.....	25
4.1.3.10	Größenausschlusschromatographie.....	25
4.1.3.10.1	Reinigung von Proteinen	25
4.1.3.10.2	Untersuchung von Komplexen aus hTNF und <i>Nanobody</i>	26
4.1.3.10.3	Größenberechnung der Proteine.....	27
4.1.3.11	MALDI-TOF (<i>Matrix-assisted laser desorption ionization – time of flight</i>) Massenspektrometrie.....	27
4.1.3.12	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ELISA).....	27
4.1.3.12.1	Kompetitiver ELISA	28
4.1.3.13	Dimerisierung des S-tag Fusionsproteins ^{Ec} anti-hTNF-VHH-S-tag durch die Mikrobielle Transglutaminase (MTG)	28
4.1.4	Pflanzenbiochemische Methoden.....	29
4.1.4.1	Transformation von Tabakpflanzen	29

4.1.4.2	Reinigung der rekombinanten Pflanzenproteine	29
4.1.4.2.1	Reinigung von ^{Nt} anti-hTNF-VHH-100xELP durch <i>inverse transition cycling</i>	29
4.1.4.2.2	Reinigung von ^{Nt} anti-hTNF-VHH durch anti-c-myc Affinitätschromatographie	30
4.1.5	Zellbiologische Methoden.....	30
4.1.5.1	Handhabung von Zellkulturen.....	30
4.1.5.2	Zytotoxizitätsassay mit hTNF auf murinen L929-Zellen.....	31
4.1.5.3	Stimulationsassay mit hTNF auf humanen HEK293-Zellen.....	32
4.1.6	Tiermodell	32
4.1.6.1	Lipopolysaccharid (LPS) / D-Galaktosamin (D-Gal) Sepsismodell der Maus	32
4.2	Materialien	33
4.2.1	Bakterienstämme	33
4.2.2	Säugerzelllinien	33
4.2.3	Pflanzen	33
4.2.4	Tiere	33
4.2.5	Enzyme.....	33
4.2.6	<i>Aqua bidestillata</i>	34
4.2.7	Antikörper	34
4.2.8	Proteinpräparationen	34
4.2.9	Medien und Seren.....	34
4.2.10	Antibiotika.....	34
4.2.11	Primer	35
4.2.12	Vektoren & Plasmide	35
4.2.13	Längenstandards.....	35
4.2.14	Sonstige gebrauchsfertige Agenzien(-mischungen) und Kits	36
4.2.15	Verbrauchsmaterialien	36
4.2.16	Vorgepackte Säulen.....	36
4.2.17	Geräte	36
4.2.18	Chemikalien	38
4.2.19	Sonstige Puffer	39

5	Ergebnisse	41
5.1	Erzeugung dimerer Nanobodies mit erhöhter hTNF neutralisierender Aktivität mittels Mikrobieller Transglutaminase	41
5.1.1	Herstellung von ^{Ec} anti-hTNF-VHH, monomerem und dimerem ^{Ec} anti-hTNF- VHH-S-tag in <i>E. coli</i>	41
5.1.1.1	Klonierung von ^{Ec} anti-hTNF-VHH und ^{Ec} anti-hTNF-VHH-S-tag	41
5.1.1.2	Expression und Reinigung von ^{Ec} anti-hTNF-VHH und ^{Ec} anti-hTNF-VHH-S- tag per Nickel-NTA Affinitätschromatographie	42
5.1.1.3	Reinigung von ^{Ec} anti-hTNF-VHH und ^{Ec} anti-hTNF-VHH-S-tag mittels Größenausschlusschromatographie	44
5.1.1.4	Verifizierung des Molekulargewichtes von ^{Ec} anti-hTNF-VHH mittels MALDI-TOF (<i>matrix assisted laser desorption/ionisation – time of flight</i>) Massenspektrometrie	46
5.1.1.5	Herstellung dimerer ^{Ec} anti-hTNF-VHH-S-tag Nanobodies durch die Mikrobielle Transglutaminase (MTG)	47
5.1.1.5.1	Optimierung der Dimerisierung von ^{Ec} anti-hTNF-VHH-S-tag durch MTG	47
5.1.1.5.2	Trennung der mono-, di-, und multimeren ^{Ec} anti-hTNF-VHH-S-tag Proteine mittels Größenausschlusschromatographie	52
5.1.2	Untersuchung der Proteineigenschaften von ^{Ec} anti-hTNF-VHH, monomeren und dimerem ^{Ec} anti-hTNF-VHH-S-tag	53
5.1.2.1	hTNF Bindungs- und Neutralisierungsverhalten von ^{Ec} anti-hTNF-VHH und ^{Ec} anti-hTNF-VHH-S-tag	53
5.1.2.1.1	^{Ec} anti-hTNF-VHH und ^{Ec} anti-hTNF-VHH-S-tag binden hTNF im ELISA.	53
5.1.2.1.2	^{Ec} anti-hTNF-VHH und ^{Ec} anti-hTNF-VHH-S-tag besitzen eine vergleichbare hTNF neutralisierende Aktivität im L929- Zytotoxizitätsassay	53
5.1.2.1.3	In der Größenausschlusschromatographie bindet ein ^{Ec} anti-hTNF-VHH-S- tag an trimeres hTNF	55
5.1.2.1.4	Enbrel® (Etanercept) konkurriert mit ^{Ec} anti-hTNF-VHH-S-tag um die hTNF Bindung	57

5.1.2.2	hTNF Bindungs- und Neutralisierungsverhalten von dimerem (und multimerem) ^{Ec} anti-hTNF-VHH-S-tag.....	57
5.1.2.2.1	Dimeres und multimeres ^{Ec} anti-hTNF-VHH-S-tag binden hTNF im ELISA.....	57
5.1.2.2.2	Dimeres und multimeres ^{Ec} anti-hTNF-VHH-S-tag besitzen eine deutlich höhere hTNF neutralisierende Aktivität im L929-Zytotoxizitätsassay....	58
5.1.2.2.3	Dimeres ^{Ec} anti-hTNF-VHH-S-tag besitzt eine deutlich höhere hTNF neutralisierende Aktivität im HEK293-Zellen Stimulationsassay	60
5.1.2.3	Monomeres und dimeres ^{Ec} anti-hTNF-VHH-S-tag besitzen hTNF neutralisierende Aktivität <i>in vivo</i> und verhindern den Tod im Lipopolysaccharid (LPS) / D-Galaktosamin (D-Gal) Sepsismodell der Maus	61
5.2	Expression eines aktiven anti-hTNF-VHH-ELP (<i>elastin-like polypeptide</i>) Fusionsproteins in Tabakpflanzen.....	62
5.2.1	Herstellung von ^{Ec} anti-hTNF-VHH-100xELP in <i>E. coli</i>	62
5.2.1.1	Klonierung von ^{Ec} anti-hTNF-VHH-100xELP in einen <i>E. coli</i> Expressionsvektor	62
5.2.1.2	Expression von ^{Ec} anti-hTNF-VHH-100xELP in <i>E. coli</i> und seine Reinigung.	63
5.2.2	Testung von in <i>E. coli</i> hergestelltem ^{Ec} anti-hTNF-VHH-100xELP.....	64
5.2.2.1	In <i>E. coli</i> hergestelltes ^{Ec} anti-hTNF-VHH-100xELP bindet in ähnlichem Ausmaß wie ^{Ec} anti-hTNF-VHH und ^{Ec} anti-hTNF-VHH-S-tag an hTNF im ELISA.....	64
5.2.3	Herstellung von ^{Nt} anti-hTNF-VHH und ^{Nt} anti-hTNF-VHH-100xELP in Tabakpflanzen	65
5.2.3.1	Klonierung von ^{Nt} anti-hTNF-VHH und ^{Nt} anti-hTNF-VHH-100xELP in einen Tabakpflanzen-Expressionsvektor.....	65
5.2.3.2	Expression von ^{Nt} anti-hTNF-VHH und ^{Nt} anti-hTNF-VHH-100xELP in Tabakpflanzen	67
5.2.3.2.1	Testexpression von ^{Nt} anti-hTNF-VHH und ^{Nt} anti-hTNF-VHH-100xELP in transient transfizierten Tabakblättern.....	67

5.2.3.2.2	Expression von ^{Nt} anti-hTNF-VHH und ^{Nt} anti-hTNF-VHH-100xELP in stabil transfizierten Tabakpflanzen	68
5.2.3.3	Reinigung von ^{Nt} anti-hTNF-VHH und ^{Nt} anti-hTNF-VHH-100xELP aus Tabakpflanzen	69
5.2.4	Erste Vortestung von in Tabakpflanzen hergestelltem ^{Nt} anti-hTNF-VHH und ^{Nt} anti-hTNF-VHH-100xELP im L929-Zytotoxizitätsassay	71
5.2.4.1	^{Nt} anti-hTNF-VHH-100xELP aus Tabakpflanzen besitzt hTNF neutralisierende Aktivität	71
5.2.4.2	^{Nt} anti-hTNF-VHH aus Tabakpflanzen zeigt qualitativ hTNF neutralisierende Aktivität.....	71
6	Diskussion	73
6.1	Antikörpertherapien und die Notwendigkeit zur Kostensenkung.....	73
6.2	Verknüpfung von ^{Ec} anti-hTNF-VHH-S-tag mittels Mikrobieller Transglutaminase (MTG)	74
6.2.1	Hintergründe.....	74
6.2.1.1	Tumor Nekrose Faktor	74
6.2.1.2	Single-domain Antikörper (Nanobodies).....	75
6.2.1.3	Mikrobielle Transglutaminase als posttranslationale Modifikationsalternative	78
6.2.1.3.1	Modellsystem Dimerisierung	80
6.2.2	Ergebnisdiskussion.....	81
6.2.2.1	Expression und Eigenschaften der beiden Konstrukte ^{Ec} anti-hTNF-VHH und ^{Ec} anti-hTNF-VHH-S-tag	81
6.2.2.2	Dimerisierung von ^{Ec} anti-hTNF-VHH-S-tag mittels MTG.....	83
6.2.2.3	Eigenschaften dimeren (und multimeren) ^{Ec} anti-hTNF-VHH-S-tags	88
6.2.3	Beantwortung der ersten Fragestellung.....	91
6.2.4	Ausblick	91
6.3	Expression eines aktiven <i>Nanobody</i> -ELP (<i>elastin-like polypeptide</i>) Fusionsproteins (^{Nt} anti-hTNF-VHH-100xELP) in <i>Nicotiana tabacum</i>	92
6.3.1	Hintergründe.....	92
6.3.2	Diskussion der Ergebnisse	93

6.3.2.1	Expression von anti-hTNF-VHH-100xELP in <i>E. coli</i> (^{Ec} anti-hTNF-VHH-100xELP)	93
6.3.2.2	Expression von anti-hTNF-VHH-100xELP in Tabakpflanzen (^{Nt} anti-hTNF-VHH-100xELP)	94
6.3.3	Beantwortung der zweiten Fragestellung	95
6.3.4	Ausblick und bereits erfolgte weiterführende Experimente.....	95
7	Zusammenfassung.....	97
8	Literaturverzeichnis.....	98
9	Danksagung.....	107
10	Lebenslauf.....	X
11	Veröffentlichungen.....	XI
12	Anhang.....	XII

2 Abkürzungsverzeichnis und Begriffserklärung

CDR	<i>complementarity determining region</i> = Antigen-spezifität determinierende Region
D-Gal	D-Galaktosamin
ELP	<i>elastin-like polypeptide</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Fab	<i>fragment antigen binding</i>
FR	<i>framework region</i> = „Gerüst“
hTNF	humaner Tumor Nekrose Faktor
Kan	Kanamycin
LeB4 SP	Legumin bindendes Protein 4 - Signal Peptid
LPS	Lipopolysaccharid
MTG	mikrobielle Transglutaminase
MW	Molekulargewicht
scFv	<i>single-chain fragment variable</i> – variabler Teil eines IgG1 Antikörpers
<i>tag</i>	Anhang
VHH	<i>single-domain</i> Antikörper / <i>Nanobody</i>

3 Einleitung

Antikörper werden in einer Vielzahl von Krankheiten zur therapeutischen Blockade von schädigenden Botenstoffen verwendet. So kommen z.B. Tumor Nekrose Faktor (TNF) neutralisierende Antikörper und Antikörperfragmente bei schweren Fällen Rheumatoider Arthritis und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zum Einsatz (An 2010). Generell existiert dabei aufgrund vorteilhafter Eigenschaften ein Trend zu immer kleineren Antigen-neutralisierenden Molekülen (Pluckthun und Pack 1997).

Die vorliegende Arbeit behandelt zwei Fragestellungen zur Untersuchung eines neuartigen Typs von besonders kleinen Antikörperfragmenten, sogenannten Eindomänenantikörpern (*single-domain antibodies*) oder *Nanobodies*.

Die erste Fragestellung dreht sich um die Anwendbarkeit eines spezifischen Enzyms, der Mikrobiellen Transglutaminase, zur gezielten nachträglichen Modifizierung von *Nanobodies*.

Die zweite Fragestellung beschäftigt sich mit einem *Nanobody*, gekoppelt an ein Elastin-ähnliches Polypeptid mit besonderen Eigenschaften: seiner Herstellbarkeit in Tabakpflanzen sowie seiner Funktionalität.

Auf diese beiden Fragestellungen wird anhand eines *Nanobodies* gegen den humanen Tumor Nekrose Faktor (hTNF) nachfolgend im Einzelnen näher eingegangen.

3.1 Modifizierung eines Nanobodies mittels Mikrobieller Transglutaminase

3.1.1 Proteinmodifizierung und -verknüpfung

Die Fusionierung von Proteinen unterschiedlicher Funktionen ist weit verbreitet. Ebenso werden häufig auch andere nicht-proteinartige Moleküle an Proteine gekoppelt. Ziel dabei ist es, jeweils erwünschte Funktionen zu kombinieren und damit neuartige oder effizientere Anwendungsmöglichkeiten zu eröffnen. Einige Proteinvarianten werden für neuartige Zielwirkung oder bessere Anwendbarkeit entworfen, andere zur Vereinfachung der Herstellung oder Weiterverarbeitung.

Ein klassisches Beispiel ist dabei der Einsatz von Antikörpern. Ihre Spezifität soll mit Funktionen anderer Effektoren kombiniert werden. So wurden z.B. therapeutische Antikörper gekoppelt an ein Radiotherapeutikum (Ibritumomab) oder Chemotherapeutikum (Mylotarg[®])

entwickelt (An 2010). In Diagnostik und Forschung werden sie an Enzyme oder andere Signalgeber gekoppelt (Tanaka *et al.* 2004).

Darüber hinaus wird PEG (Polyethylenglykol) zur Verlängerung der Halbwertszeit an Proteine angefügt (PEG-INF α oder Certolizumab) (Karow 2009b; UCB-Pharma 2010). Zur besseren Nachweisbarkeit und Anwendbarkeit werden Proteine im Nachhinein z.B. biotinyliert (z.B. (Abe *et al.* 2010)) oder bekommen von vornherein einen spezifischen Proteinanhang (*tag*) angefügt (z.B. (Conrath *et al.* 2001; Harmsen *et al.* 2007)). Auf diese Weise wird oft auch die Reinigung des Proteins nach der heterologen Expression in Pro- oder Eukaryotischen Organismen vereinfacht (Floss *et al.* 2010).

Speziell zur Erzeugung solcher „Proteinchimären“, die nur aus Proteinbausteinen bestehen, existieren mehrere Möglichkeiten: molekulargenetisch, chemisch oder enzymatisch.

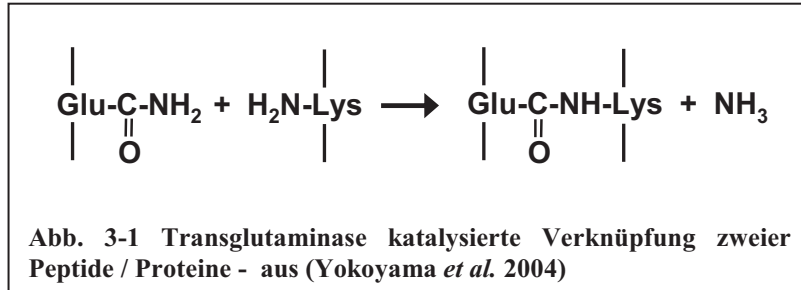
Heutzutage werden dafür vor allem molekulargenetische Verfahren angewendet. Dies kann jedoch z.B. bei direkter Fusionierung mittels flexiblen Peptid-*linkers* zu Problemen bei der Expression der größeren Moleküle führen. Oft wird die Ausbeute geringer oder die Proteinkonstrukte sind nicht funktional (Takazawa *et al.* 2004; Tanaka *et al.* 2004; Tominaga *et al.* 2007). Alternativ kann das Anhängen einer Vielzahl von „*self-assembling*“ Domänen als Ansatz zur Di- oder Multimerisierung von Proteinen genutzt werden (z.B. *leucin-zipper*, *helix-turn-helix* Motive oder CH3-Antikörperdomänen (Pluckthun und Pack 1997)). Allerdings bleibt die Molekulargenetik weitgehend auf Protein-Protein-Konstrukte beschränkt (Takazawa *et al.* 2004; Tanaka *et al.* 2004; Tominaga *et al.* 2007).

Chemische Methoden können prinzipiell jede Art von Substrat verknüpfen und ermöglichen damit auch die Fusionierung von Protein mit Nicht-Protein-Anteilen. Ihr zentraler Nachteil ist jedoch ihre geringe Spezifität sowie die oft wenig schonenden Reaktionsbedingungen. Beides kann zu geringer Ausbeute an erwünschtem, funktionellem Produkt führen.

Enzymatische posttranslationale Verfahren, oft kombiniert mit molekulargenetischem Anfügen spezifischer Zielpeptide, vereinigen die Vorteile der beiden Ansätze. Ihre Spezifität ist deutlich höher als die chemischer Verfahren, sie sind meist sehr schonend und ermöglichen oft auch die Verknüpfung von Proteinen mit Nicht-Protein-Anteilen. Darüber hinaus umgehen sie mögliche Expressionsprobleme bei großen komplexen Fusionsproteinen (Takazawa *et al.* 2004; Tanaka *et al.* 2004; Tominaga *et al.* 2007). Ein dafür hervorragend geeignetes Enzym ist die Mikrobielle Transglutaminase. Neben ihr existieren eine Reihe weiterer verwendbarer Enzyme wie z.B. die *E. coli* Biotin Ligase oder die Sortase (Abe *et al.* 2010).

3.1.2 Mikrobielle Transglutaminase (MTG)

Transglutaminasen sind Enzyme, die sequenzspezifisch Proteine quervernetzen können. Sie



sind von Bakterien bis zu Säugetieren extrem weitverbreitet und kommen in den meisten Gewebetypen vor. Sie spielen beispielsweise eine Rolle in

der Aufrechterhaltung der Gewebestruktur (Furutani *et al.* 2001), bei der Blutgerinnung und Wundheilung (Yokoyama *et al.* 2004) sowie vermutlich bei neurodegenerativen Krankheiten (Fontana *et al.* 2008). Transglutaminasen katalysieren eine Acyltransfer-Reaktion zwischen einem Glutamin (Acyl-Donor) und einem Lysin (bevorzugter Acyl-Akzeptor), bei dem das Amin in der Amidgruppe des Glutamins durch ein anderes, üblicherweise aus Lysin, ersetzt wird. Dabei entsteht zwischen den Aminosäuren-seitenketten eine kovalente Isopeptidbindung (Furutani *et al.* 2001; Yokoyama *et al.* 2004; Tagami *et al.* 2009) mit hoher Stabilität (Zhu und Tramper 2008) (Abb. 3-1).

Aktuell wird die Mikrobiellen Transglutaminasen (MTG) in der Lebensmittelindustrie verwendet (Zhu und Tramper 2008), wobei die verstärkte Proteinquervernetzung zur Aufbesserung der Nahrungsmitteltextrur und -konsistenz z.B. fettreduzierter oder oft auch minderwertiger Ware genutzt wird (Buchert *et al.* 2010) und gleichzeitig die Haltbarkeit verlängert wird. Technische Anwendungen sind noch in der Entwicklung (Zhu und Tramper 2008).

Die künstliche Verknüpfung rekombinanter Proteine mittels MTG stellt eine Kombination aus Molekulargenetik und posttranslationaler Modifikation dar. Meist wird Proteinen eine spezifische Proteinsequenz wie z.B. ein sogenannter *S-tag* angehängt. Der *S-tag* besteht aus dem Ribonuklease A S-Peptid und wird von der MTG spezifisch und mit hoher Effizienz verknüpft (Kamiya *et al.* 2003b; Tanaka *et al.* 2004).

Die MTG ermöglicht eine einfache, sehr effiziente und äußerst anspruchslose gezielte posttranslationale Quervernetzung von Proteinen unter milden Bedingungen (Takazawa *et al.* 2004; Tanaka *et al.* 2004; Zhu und Tramper 2008) sowie ihre Modifizierung mittels nicht proteinartiger Klein- oder Makro-Molekülen (Abe *et al.* 2010). All dies, die bestehende Erfahrung in der Verwendung im industriellen Maßstab sowie die billige Erhältlichkeit, macht

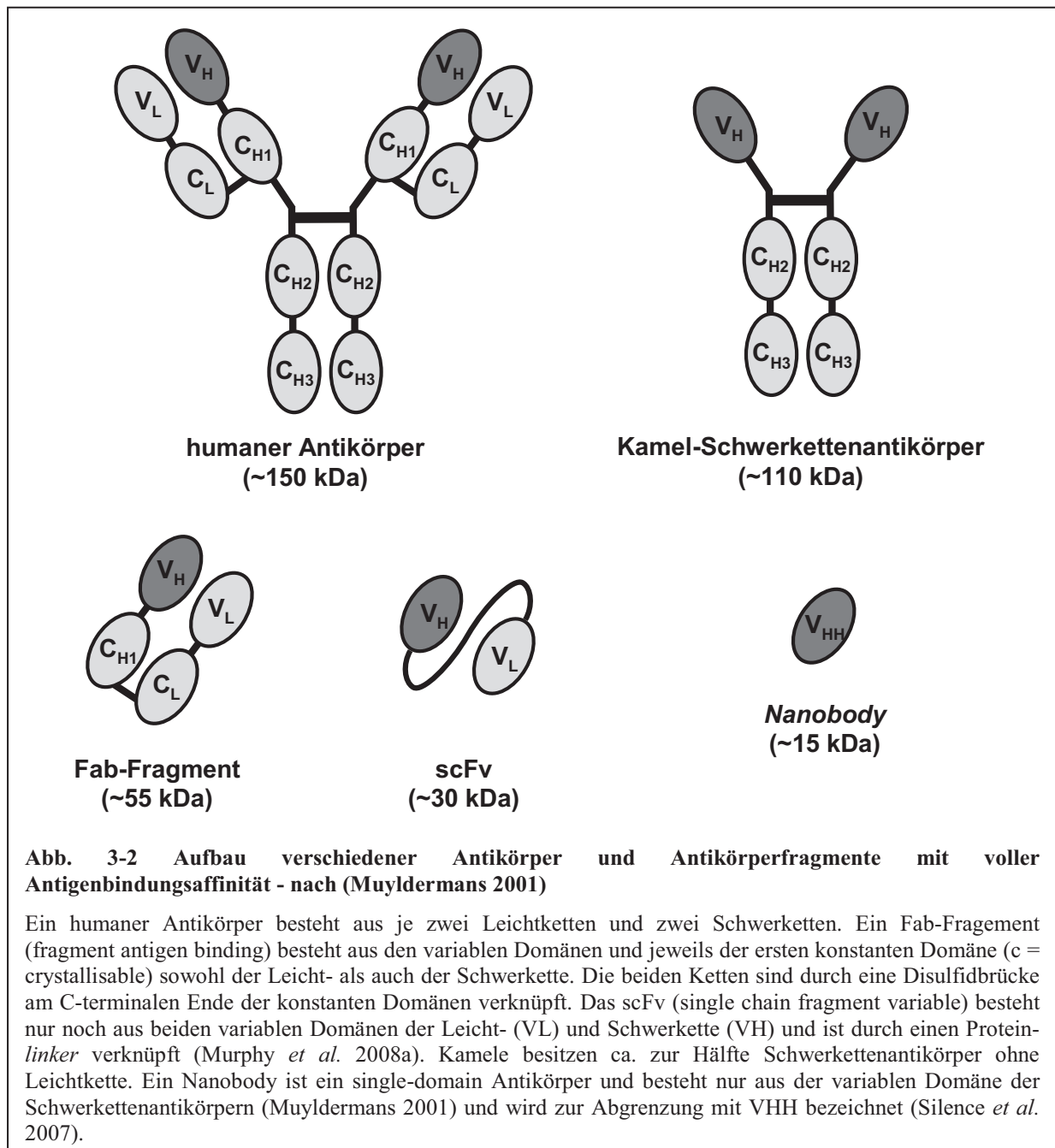
die Transglutaminase letztendlich zu einem äußerst interessanten Kandidaten für die kostengünstige pharmazeutische Herstellung chimärer Proteinfusionskonstrukte – besonders solcher die nicht einfach molekulargenetisch erzeugt werden können. (Zhu und Tramper 2008). Eine weitere ebenso viel versprechende Anwendungsmöglichkeit stellt die spezifische Fixierung von Proteinen auf Materialoberflächen z.B. in Bioreaktoren dar (Moriyama *et al.* 2011).

Mittels MTG wurden unter anderem bereits Antikörper (Abe *et al.* 2010) sowie Antikörperfragmente (scFv = *single-chain Fragment variable*) (Kamiya *et al.* 2003a; Takazawa *et al.* 2004) posttranslational modifiziert. Ihre Anwendung an noch kleineren Antikörpern mit besonderen Eigenschaften, sogenannten Nanobodies (Kolkman und Law 2010), wurde unseres Wissens aber bisher nicht erprobt.

3.1.3 *Single-domain* Antikörper (*Nanobodies*)

Nanobodies oder *single-domain* Antikörper bestehen nur aus der variablen Domäne von Schwerekettenantikörpern. Diese kommen neben der Familie der Kamele (Muyldermans 2001) aber auch bei Haien vor (Greenberg *et al.* 1995; Wesolowski *et al.* 2009). Schwerekettenantikörpern fehlen die bei „vollständigen“ Antikörpern an der Antigenbindung beteiligten Leichtketten (Hamers-Casterman *et al.* 1993).

Während normalerweise sechs hypervariable Bereiche, je drei pro Leicht- und Schwerekette, die antigenbindende Region bilden und die Antigenpezifität definieren (CDR - *complementarity determining regions*) (Murphy *et al.* 2008a), sind es bei Schwerekettenantikörpern nur drei CRDs. (Die weniger variablen Bereich dazwischen werden als „Gerüst“ (*framework region* = FR) bezeichnet.) Aufgrund von erhöhter Variabilität durch Veränderungen in den CDRs (Muyldermans 2001; Kolkman und Law 2010) stellen sie trotzdem funktionelle Antikörper mit voller Antigenbindungsaffinität, -spezifität und -diversität dar (Arbabi Ghahroudi *et al.* 1997; van der Linden *et al.* 1999; Muyldermans 2001). Zur Erhöhung der Gewebepenetration (Murphy *et al.* 2008a) sowie der Vielseitigkeit im therapeutischen oder diagnostischen Einsatz von Antikörpern existiert ein genereller Trend, möglichst kleine antigenbindende Moleküle herzustellen (Arbabi Ghahroudi *et al.* 1997) (siehe Abb. 3-2). Der Versuch aus humanen Antikörpern Antikörperfragmente mit nur einer Domäne (*single-domain*) herzustellen, führt zu Affinitätsverlusten und Aggregation aufgrund von Löslichkeitsproblemen, bedingt durch freiliegende hydrophobe Aminosäureseitenketten



im FR2, welche sonst für die Interaktion zwischen Leicht- und Schwerkette zuständig sind (Davies und Riechmann 1994; Muyldermans *et al.* 1994; Arbabi Ghahroudi *et al.* 1997).

In Kamelen existieren ca. zur Hälfte „reine“ Schwerkettenantikörper (Hamers-Casterman *et al.* 1993; Muyldermans 2001). Sie besitzen statt der problematischen hydrophoben hydrophile Aminosäuren, so dass aus der variablen Domäne (der Schwerkette) *single-domain* Antikörper hergestellt werden können (Muyldermans *et al.* 1994). Diese besitzen mit ca. 15 kDa (Arbabi Ghahroudi *et al.* 1997; Muyldermans 2001) nur ein Zehntel des Gewichts eines vollständigen

humanen Antikörpers (150 kDa), besitzen dafür aber nur eine Antigenbindungsstelle (Murphy *et al.* 2008a).

Diese *single-domain* Antikörper oder Nanobodies werden mit VHH abgekürzt (variable Domäne eines Schwerekettenantikörpers), wodurch sie gegenüber der variablen Domäne von klassischen Antikörpern, bestehend aus Leicht- (VL) und Schwereketten (VH), abgegrenzt werden (Silence *et al.* 2007). Die VHH besitzen aufgrund ihrer geringen Größe und ihres Aufbaus aus einer einzigen Domäne eine Reihe von Vorteilen. Zu allererst können sie im Gegensatz zu klassischen Antikörpern sehr viel einfacher und weniger kostenintensiv in Nicht-Säugetierzellen, wie z.B. Bakterien, synthetisiert werden (Arbabi Ghahroudi *et al.* 1997; Muyldermans 2001; Coppieters *et al.* 2006). Darüber hinaus sind Nanobodies äußerst stabil (Arbabi Ghahroudi *et al.* 1997; Muyldermans 2001; Kolkman und Law 2010): sie sind sehr hitzeresistent (van der Linden *et al.* 1999; Dumoulin *et al.* 2002), robust gegenüber einer Reihe denaturierender Agenzien (Muyldermans 2001; Dumoulin *et al.* 2002), sehr pH-stabil (Harmsen *et al.* 2006; van der Vaart *et al.* 2006) und relativ unempfindlich gegenüber Proteasen (Muyldermans 2001), einige teilweise sogar extrem resistent (Harmsen *et al.* 2006). Einige VHH sind sogar in der Lage nach Denaturierung ihre Konformation wieder selbstständig einzunehmen (Perez *et al.* 2001; Dumoulin *et al.* 2002; Kolkman und Law 2010). Im Gegensatz zu anderen Antikörperfragmenten (z.B. scFv) sind sie sehr gut löslich (Muyldermans 2001; Kolkman und Law 2010) und scheinen trotz ihrer Xenogenität (aus Kamelen) wenig immunogen zu sein (Cortez-Retamozo *et al.* 2002; Coppieters *et al.* 2006; Kolkman und Law 2010). Sie besitzen eine gute Gewebegängigkeit (Graff und Wittrup 2003; Tijink *et al.* 2008) und erreichen im Gegensatz zu klassischen Antikörpern in Taschen versteckte Epitope, wie z.B. aktive Zentren von Enzymen (Lauwereys *et al.* 1998) oder konservierte maskierte Epitope von Krankheitserregern (Harmsen und De Haard 2007; Forsman *et al.* 2008; Wesolowski *et al.* 2009).

Eine Vielzahl an Möglichkeiten eröffnet ihre Verwendung als modulare Bauelemente zur Konstruktion multivalenter und multispezifischer Fusionsproteine (Conrath *et al.* 2001) sowie die Kopplung an Radio- und Chemotherapeutika oder Toxine (Baral *et al.* 2006) bzw. Enzyme (Stijlemans *et al.* 2004) zur zielgenauen Umwandlung von Prodrugs (zusammenfassend: (Muyldermans 2001; Kolkman und Law 2010)).

Der größte Vorteil der Nanobodies, ihre geringe Größe, ist gleichzeitig auch ihr größter Nachteil: sie werden durch die Nierenglomeruli filtriert und besitzen nur eine sehr kurze

Halbwertszeit (Coppieters *et al.* 2006; Tijink *et al.* 2008). Ein weiterer potentieller Nachteil ist das Fehlen des Fc-Teils, der Effektor-domäne des Antikörpers. Dies muss aber keinen funktionellen Nachteil darstellen und kann je nach Anwendung auch ebenso einen Vorteil sein z.B. durch verringerte Nebenwirkungen (An 2010; KBV 2010; UCB-Pharma 2010).

Die besonderen Charakteristika der Nanobodies machen sie zu einer neuen Klasse von Medikamenten, die eine Fülle von neuen Anwendungsmöglichkeiten sowohl in medizinischen (Muyldermans 2001; Kolkman und Law 2010) aber auch in technischen Bereichen (Frenken *et al.* 2000; Joosten *et al.* 2005; Harmsen und De Haard 2007; Wesolowski *et al.* 2009) bereitstellen. Insbesondere unter dem Gesichtspunkt der enormen Belastung der Gesundheitssysteme (Dübel 2007; Drucker *et al.* 2008) stellen sie eine interessante kostengünstige Alternative zur bisherigen sehr teuren Antikörpertherapie (An 2010; KBV 2010; Kolkman und Law 2010) dar.

3.1.4 Das Entzündungszytokin Tumor Nekrose Faktor

hTNF, humaner Tumor Nekrose Faktor (alpha) ist ein Trimer (Eck und Sprang 1989; Hehlhans und Pfeffer 2005) und existiert sowohl als membranständiges (Idriss und Naismith 2000), als auch als lösliches Protein (17,4 kDa) (Eck und Sprang 1989; Idriss und Naismith 2000). TNF-alpha Converting Enzyme (TACE = ADAM17 = A Disintegrin and Metalloproteinase 17) überführt es nach verschiedenen Stimuli in die lösliche Form (Peschon *et al.* 1998a). Seine beiden Rezeptoren TNFR I (p55) und II (p75) besitzen teils divergente, teils synergistische Funktionen (Peschon *et al.* 1998b) und können sowohl eher antiapoptotische Signalkaskaden wie z.B. den NFκB-Signalweg als auch eher proapoptische wie z.B. die Initiator-Caspase 8 aktivieren (Heyninck und Beyaert 2001; Guicciardi und Gores 2009). Die Zellantworten reichen in Abhängigkeit von der Balance der beiden größtenteils antagonistischen Signalkaskaden von Proliferation über Differenzierung und Zellüberleben bis hin zur Apoptose (Hehlhans und Pfeffer 2005).

TNF ist ein proinflammatorisches Zytokin (Löffler 2003) und ein zentraler Botenstoff der angeborenen Immunantwort (Hehlhans und Pfeffer 2005). Neben einer Reihe von Immunzellen (Caminero *et al.* 2011), aber auch Gewebezellen und Endothelzellen (Wajant *et al.* 2003; Guicciardi und Gores 2009) wird es vor allem von Makrophagen, Monozyten und T-Zellen als Antwort auf Infektion und Entzündung sezerniert (Guicciardi und Gores 2009). Insbesondere ist TNF unerlässlich für die Bekämpfung intrazellulärer Keime wie unter

anderen z.B. *M. tuberculosis*, wo es zur Bildung spezifischer T-Zellen, Abtötung und Granulombildung beiträgt (Ehlers 2003; Böcker *et al.* 2004).

Die Sezernierung des proinflammatorischen Zytokins TNF hat neben einer Reihe von lokalen, die Infektion eindämmenden (Murphy *et al.* 2008b), auch systemische Wirkungen. Zu ihnen gehört im Zusammenspiel mit IL-1 und IL-6 unter anderem die Induktion der Akut-Phase Antwort in der Leber und sowie des Fiebers durch Temperatursollerhöhung im Hypothalamus (Murphy *et al.* 2008b). Im Falle einer Fehlregulation wird TNF aufgrund seiner hohen biologischen Potenz schnell zu einem wichtigen pathogenetischen Baustein in der Krankheitsentstehung unter anderem des septischen Schocks (Murphy *et al.* 2008b), der Kachexie (Wajant *et al.* 2003). oder chronisch entzündlicher Erkrankungen wie der Rheumatoiden Arthritis oder Morbus Crohn (Hehlhans und Pfeffer 2005).

In der Sepsis spielt TNF eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie des Schocks sowie der disseminierten intravasalen Gerinnung (Murphy *et al.* 2008b). Während jedoch in einigen Mausmodellen des septischen Schocks (z.B. Lipopolysaccharid (LPS)-Applikation) mit TNF-Antagonisten deutliche Effekte zu sehen sind, ist die Mortalitätsreduktion bei Patienten in der Sepsis nicht vorhanden bzw. nur sehr gering (Rittirsch *et al.* 2007; Doi *et al.* 2009).

Im Gegensatz dazu kann eine Therapie mit TNF-neutralisierenden Agenzien bei Morbus Crohn, Rheumatoider Arthritis, sowie weiteren chronisch entzündlichen Krankheiten eindeutige klinische Verbesserungen erzielen (Hehlhans und Pfeffer 2005). (Siehe auch Tab. 6-1)

3.2 Erste Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit wird untersucht, ob Nanobodies mittels Mikrobieller Transglutaminase (MTG) posttranslational verändert werden können. Nanobodies besitzen eine Reihe von sehr vorteilhaften Eigenschaften, aufgrund derer ihre zukünftige breite Anwendung in der Medizin nur noch eine Frage der Zeit ist (Kolkman und Law 2010). Die Untersuchung der MTG als einziges zurzeit im kommerziellen Maßstab in Lebensmittelqualität erhältliches Protein-quervernetzendes Enzym (Buchert *et al.* 2010) zur posttranslationalen Modifizierung von Nanobodies erscheint da nur naheliegend. Aufgrund der großen Bedeutung von hTNF in einer Reihe von Autoimmunkrankheiten sowie der fortgeschrittenen Forschung von anti-hTNF Nanobodies haben wir uns entschieden, einen

dieser Nanobodies zum „proof of principle“ zu verwenden (VHH#3E aus Patent Nr. US20070077249A1 (Silence *et al.* 2007)).

Als Modellsystem wählten wir die Dimerisierung des anti-hTNF-VHH Nanobodies über ein fusioniertes *S-tag* (anti-hTNF-VHH-S-tag), für das eine spezifische Verknüpfung mittels MTG berichtet wurde (Kamiya *et al.* 2003b). Eine solche Dimerisierung von monovalenten Antikörperfragmenten, z.B. Single-domain Antikörper wie Nanobodies, führt oft zu einer erheblichen Aktivitätssteigerung (Coppieters *et al.* 2006; Silence *et al.* 2007).

Als Modellsystem der posttranslationalen Modifizierung von Nanobodies mittels MTG haben wir uns mit der Frage befasst, ob die Dimerisierung von anti-hTNF-VHH-S-tag durch *S-tag* und MTG zu einer gesteigerten hTNF Neutralisierungsaktivität führt.

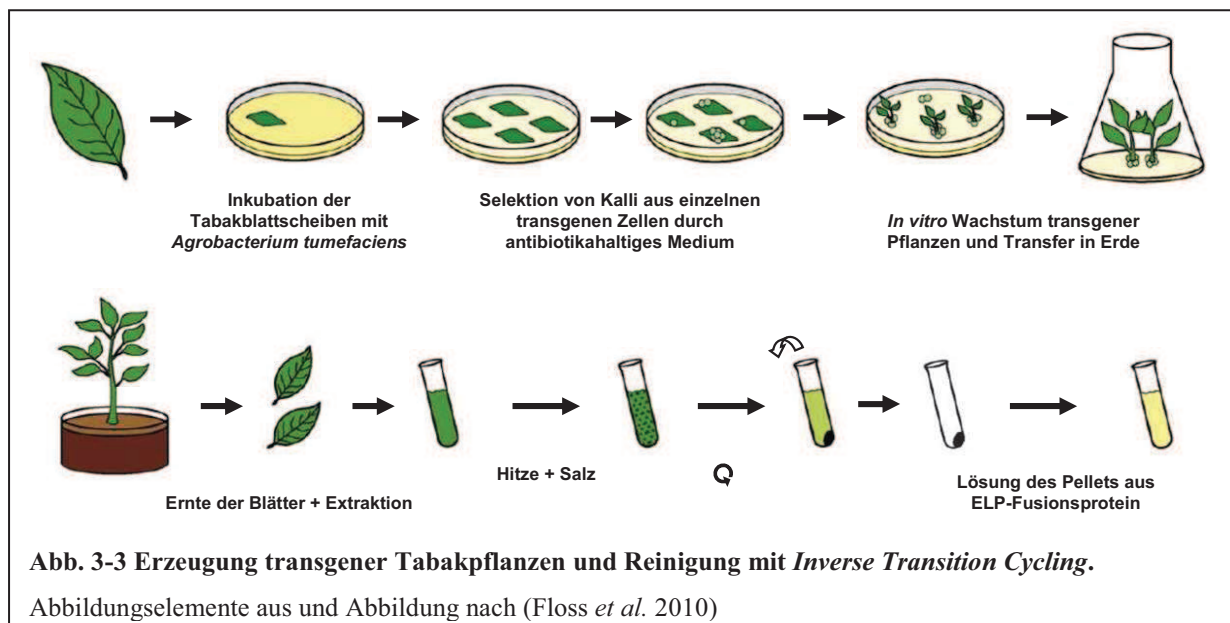
3.3 Pflanzenexpression eines Nanobodies mit Hilfe eines Elastin-ähnlichen Polypeptids (*elastin-like polypeptide*; ELP)

3.3.1 Heterologe Expression rekombinanter Proteine in Pflanzen

Die Herstellung von rekombinanten Proteinen in Pflanzen stellt eine wichtige Alternative zu Zellkulturen von Mikroorganismen oder Eukaryoten als Expressionssysteme dar. Ihre zentralen Vorteile sind das Fehlen von menschlichen Pathogenen, einfache Handhabbarkeit, niedrige Kosten sowie eine nahezu herausragende Skalierbarkeit. Pflanzenexpression von rekombinanten Biopharmazeutika (*biologicals*) in großem Maßstab wäre in der Lage die Kosten deutlich zu reduzieren (Conrad und Fiedler 1998; Ma *et al.* 2003) und so die Belastung des Gesundheitssystems besonders durch neue rekombinante Pharmaka (Dübel 2007; Drucker *et al.* 2008) zu verringern.

Eine Reihe von verschiedenen Pflanzen wurde bisher zur Herstellung rekombinanter Proteine verwendet. Darunter sind unter anderem Tabakpflanzen, Kartoffeln, Bohnen, Tomaten und Getreidesorten wie Reis oder Mais (Ma *et al.* 2003). Die rekombinanten Proteine können dabei je nach verwendetem Expressionspromotor in verschiedenen Teilen der Pflanze produziert und angereichert werden. Dies bietet je nach Ort unterschiedliche Vorteile. Die Expression in Saatträgern führt oft aufgrund der besonderen Mikrobedingungen zu einer hohen Stabilität der Proteine in dem Saatträger, wodurch eine gute Lagerbarkeit bedingt ist (Ma *et al.* 2003; Floss *et al.* 2010). Da bereits Verfahren zur Abtrennung vom Rest der Pflanze existieren, ist darüber hinaus die „Ernte“ einfach. Dies gilt ebenso für die Expression in Blättern (Conrad und Fiedler 1998; Scheller *et al.* 2004).

Eine gut untersuchte Pflanze ist die Tabakpflanze (*Nicotiana tabacum*) (Abb. 3-3). Sie bietet neben gut etablierter genetischer Modifizierung die Vorteile eines hohen Ertrages an Blatt-Biomasse, so dass die Expression in Blättern naheliegend ist (Ma *et al.* 2003; Conley *et al.* 2011). Dafür werden die Tabakblattscheiben durch das gramnegative Bodenbakterium *Agrobacterium tumefaciens* mit einem Pflanzenexpressionsplasmid mit passendem Promotor transfiziert. Das *Agrobacterium* stellt mit seiner besonderen Fähigkeit des horizontalen Gentransfers eins der zentralen Werkzeuge in der Genmanipulation von Pflanzen dar. Es baut die gewünschte DNA-Sequenz ungezielt in das Genom der Pflanze ein und ermöglicht so eine stabile Transfektion (Horsch *et al.* 1985; Ma *et al.* 2003; Tzfira und Citovsky 2006; Floss *et al.* 2010), so dass eine Weitergabe in die nächste Generation stattfindet (Scheller *et al.* 2004; Floss *et al.* 2008). Aus einzelnen transgenen Zellen der transfizierten Blattscheiben werden auf Selektionsmedium neue Pflanzenkalli herangezogen (Horsch *et al.* 1985). Je nach angesteuertem Zellkompartiment differiert die Menge an sich anreicherndem Protein. Aufgrund von hoher Stabilität des Proteins und Akkumulation großer Proteinmengen (Conrad und Fiedler 1998) gilt die Retention im Endoplasmatischen Retikulum (ER) als eine gute Strategie zur Herstellung rekombinanter Proteine (Floss *et al.* 2010), insbesondere von Antikörperfragmenten (Conrad und Fiedler 1998).



3.3.2 Elastin-ähnliche Polypeptide

Klassische auf Affinitätschromatographie beruhende Reinigungsmethoden rekombinanter Proteine eignen sich nur schlecht für die Verwendung in großem Maßstab und können schnell

einen Großteil der Produktionskosten ausmachen (Conley *et al.* 2011). Vor einiger Zeit wurde mit dem *inverse transition cycling* (ITC) ein neuartiges Verfahren eingeführt, welches besonders durch seine sehr einfache, schnelle und einfach skalierbare Durchführung besticht (Abb. 3-3). Die ITC beruht auf dem Prinzip, dass manche Polymer-Moleküle bei höheren Temperaturen (oberhalb der sogenannten Transitionstemperatur) und Salzkonzentrationen reversibel unlöslich werden. Die unlöslichen Aggregate werden dann durch Zentrifugation abgetrennt und anschließend wieder gelöst (Meyer und Chilkoti 1999; Floss *et al.* 2010).

Der Proteinanhang, der die Reinigung mittels ITC ermöglicht, ist das Elastin-ähnliche Polypeptid (*elastin-like polypeptide* = ELP) (Meyer und Chilkoti 1999). Es besteht (in unserem Fall) aus einer 100-fachen Wiederholung (100xELP) des Motivs VPGXG, wobei X für V, G und A stehen kann (im Verhältnis 5 : 3 : 2) (Meyer und Chilkoti 1999; Scheller *et al.* 2004; Scheller *et al.* 2006). Repetitive Sequenzen dieser Art sorgen in Elastin für die reversible Dehnbarkeit (Floss *et al.* 2010). Obwohl das 100xELP aus hydrophoben Aminosäuren besteht, ist es unterhalb der Transitionstemperatur gut wasserlöslich (Conrad und Fiedler 1998).

Die reversible Aggregation beruht vermutlich auf einer reversiblen bisher nicht genau bekannten Veränderung der Sekundärstruktur des ELP-Proteinschwanzes (Serrano *et al.* 2007; Floss *et al.* 2010), die zu einer geordneten Zusammenlagerung der hydrophoben ELP-Regionen unter Ausschluss von Wasser führt (Floss *et al.* 2008). ELP kann somit z.B. für neuartige präzise mittels Temperatur oder Salzkonzentration in seinen Eigenschaften steuerbare Materialien in Medizin und Biotechnologie verwendet werden (Floss *et al.* 2010). Da ELP dem Säugetier-Elastin nachempfunden ist, ist es immunologisch unsichtbar (Floss *et al.* 2010). Dies führt zu einer guten Verträglichkeit und Biokompatibilität (Urry *et al.* 1991), welche z.B. den Einsatz als Depotformulierung (Shamji *et al.* 2008) oder zur gesteuerten Medikamentenabgabe in Tumoren durch lokale Hyperthermie (Dreher *et al.* 2007) möglich machen.

Darüber hinaus hat es den entscheidenden Vorteil, dass es den Ertrag von anderen Proteinen in Tabakpflanzen steigert (Scheller *et al.* 2006; Floss *et al.* 2010) unter anderem, in dem es die Stabilität und Löslichkeit von Proteinen erhöht (Floss *et al.* 2008; Conley *et al.* 2011). Am wichtigsten dürfte dabei allerdings die ELP-induzierte Lagerung in Speichervakuolen - sogenannten „protein bodies“ – der ins ER dirigierten Fusionsproteine sein. Dort sind sie vor

Abbau und Funktionsminderung durch Degradation und Proteasen geschützt und vermutlich wird die Expression durch Entlastung des ERs zusätzlich gesteigert (Conley *et al.* 2011).

In der Zusammenschau stellt die Expression von ELP-Fusionsproteinen in Tabakpflanzen und ihre Reinigung eine äußerst kostengünstige und einfach durchzuführende Herstellung für große Mengen an rekombinantem Protein dar. Nach der Erzeugung von stabil transfizierten Pflanzen ist diese Methode ein Verfahren mit äußerst geringen Technologieanforderungen zur Gewinnung rekombinanter Proteine (Floss *et al.* 2010).

3.3.3 *Nanobody*-ELP Fusionsprotein

Eine Einschränkung der Nanobodies ist ihre kurze Halbwertszeit *in vivo*. Aufgrund ihrer geringen Größe werden sie rasch glomerulär abfiltriert (Tijink *et al.* 2008). Zur Verlängerung der Halbwertszeit gibt es eine Reihe von Ansätzen. Dazu gehören das Bilden bispezifischer Konstrukte durch Anfügen einer weiteren Domäne mit Albuminspezifität (Dennis *et al.* 2002; Coppieters *et al.* 2006; Tijink *et al.* 2008) oder die PEG-ylierung, die bereits für eine Reihe Therapeutika angewandt wurde (z.B. (PEG-INF α oder Certolizumab) (Karow 2009b; UCB-Pharma 2010). Eine weitere, der PEG-ylierung entsprechende Möglichkeit besteht im Anhängen eines ELP-Schwanzes. ELP ist ebenfalls sehr biokompatibel (Urry *et al.* 1991; Floss *et al.* 2010) und aufgrund seiner Größe würde das Fusionsprodukt vermutlich nicht mehr durch die Nierenglomeruli filtriert werden (Tijink *et al.* 2008). Damit bestehen bei einem *Nanobody*-ELP Konstrukt gewisse Parallelen zu dem monovalenten PEG-ylierten Certolizumab ohne Fc-Teil, welches erfolgreich in der Therapie der Rheumatoiden Arthritis eingesetzt wird (KBV 2010; UCB-Pharma 2010).

Antikörper und ihre Fragmente wurden bereits vielfach in Pflanzen hergestellt (Conrad und Fiedler 1998; Ma *et al.* 2003) so auch Nanobodies (Muyldermans 2001; Jobling *et al.* 2003; Teh und Kavanagh 2010). Die Fusion mit ELP konnte bereits für komplette Antikörper (Floss *et al.* 2008; Floss *et al.* 2010) und Antikörperfragmente wie scFv (Scheller *et al.* 2006) eine deutliche Steigerung der Expression in Tabakpflanzen zeigen. Da für Nanobodies bisher nur in transienten Systemen hohe Expressionslevel erreicht wurden (Teh und Kavanagh 2010), kann möglicherweise ein ELP-Fusionsprotein den Ertrag an Nanobodies in stabil transfizierten Tabakpflanzen deutlich steigern. Darüber hinaus macht die extrem einfache Reinigung ein solches Fusionsprotein interessant. Die Kombination aus bereits intrinsisch sehr stabilen Nanobodies (Kolkman und Law 2010) mit Expression in Pflanzenteilen, die gut

zur lang- (z.B. Saatträger) oder mittelfristigen (z.B. Tabakblätter) Aufbewahrung geeignet sind (Conrad und Fiedler 1998; Ma *et al.* 2003; Floss *et al.* 2010), könnten bezüglich der Verfügbarkeit und Lagerungsfähigkeit neue Dimensionen eröffnen. Darüber hinaus besitzt ein solches *Nanobody*-ELP Fusionsprotein möglicherweise sogar verbesserte Eigenschaften *in vivo*.

3.4 Zweite Fragestellung

Mit einem *Nanobody*-ELP Fusionsprotein aus Pflanzen werden drei zukunftssträchtige Ansätze (*Nanobody*, Pflanzenexpression, ELP) kombiniert, was das Potential einer deutlichen weiteren Senkung der Kosten sowie Vereinfachung der Herstellung besitzt. Deswegen wollen wir in dieser Arbeit zunächst die Aktivität eines solchen Modellfusionsproteins untersuchen.

4 Material und Methoden

4.1 Methoden

4.1.1 Molekularbiologische Methoden

4.1.1.1 Hitzeschock Transformation

50 µl kompetente *Escherichia coli* (*E. coli*) (für DNA Präparation: XL1 blue, für Proteinexpression: BL21 pLysS) wurden auf Eis für 10 min aufgetaut. 1 µl Plasmid wurde hinzugefügt und das Gemisch weitere 5 min auf Eis stehen gelassen. Nach 30 Sekunden Erhitzen auf 42°C (Thermomixer, Eppendorf) wurden die Bakterien wiederum 5 min auf Eis gekühlt. Daraufhin wurde 1 ml Antibiotika freies LB Medium hinzugegeben und der Ansatz für 1 Stunde bei 37°C (Thermomixer, Eppendorf) leicht geschüttelt (700-800 U/min). Anschließend wurden die Bakterien entsprechend den Resistenzkassetten auf antibiotikahaltigen Agarplatten (Ampicillin 100 µg/ml oder Kanamycin 50 µg/ml) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Entstandene Einzelkolonien wurden aufgenommen und in je nach Verwendungszweck unterschiedlichen Volumina antibiotikahaltigen LB-Mediums (Ampicillin 100 µg/ml oder Kanamycin 50 µg/ml) über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert.

LB-Medium

20 g NaCl
20 g Trypton/Pepton
10 g Hefeextrakt
ad 2 l *Aqua dest.*

LB-Medium-Agar

20 g NaCl
20 g Trypton/Pepton
10 g Hefeextrakt
40 g Agar
ad 2 l *Aqua dest.*

Das Gemisch wurde autoklaviert und auf ca. 50°C abgekühlt, bevor es mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt und in sterile Petrischalen (Sarstedt) gegossen wurde. Die Lagerung der Platten erfolgte bei 4°C.

4.1.1.2 Plasmid-DNA-Mini-Präparation

Zur Isolation kleiner Mengen Plasmid-DNA wurden transformierte Bakterien (*E. coli* XL1-Blue) in 2 ml antibiotikahaltigem LB-Medium über Nacht bei 37°C inkubiert. Das durch Zentrifugation abgetrennte Bakterienpellet wurde zunächst zum Abbau störender RNA Fragmente in 200 µl eines RNase-haltigen Puffers resuspendiert. Durch Zugabe von 200 µl 0,2 M NaOH und 1% SDS, 5-maliges Invertieren und 5 minütige Inkubation bei Raumtemperatur wurde die bakterielle Membran mittels alkalischer Lyse aufgebrochen. Anschließend wurde zur Proteinfällung 200 µl 7 M Ammoniumacetat hinzugegeben und für 5 min bei 13.000 g zentrifugiert. Der klare DNA-haltige Überstand wurde überführt und zur Präzipitation der DNA das dreifache Volumen an 96% Ethanol hinzugefügt. Die präzipitierte DNA wurde für 10 min bei 4°C mit 13.000 g abzentrifugiert und das entstandene Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und anschließend mittels Vakuumtrockner (Savant Universal Vacuum System Plus, UVS400A - Thermo Fisher Scientific Inc.) getrocknet. Die pelletierte DNA wurde in 30 µl H₂O resuspendiert.

4.1.1.3 Plasmid-DNA-Midi Präparation

Zur Isolation größerer Mengen Plasmid-DNA wurden transformierte Bakterien in 150-200 ml antibiotikahaltigem LB-Medium über Nacht bei 37°C unter 180 U/min inkubiert. Aus dem durch Zentrifugation abgetrennten Bakterienpellet wurde die Plasmid-DNA mit dem Nucleobond®AX-Kit (Machery-Nagel) isoliert. Es wurde nach den Angaben des Herstellers gearbeitet. Die pelletierte DNA wurde in 30 bis 50 µl H₂O resuspendiert und die DNA-Konzentration mit dem Ultraspec 3000 (Amersham Pharmacia Biotech UK Ltd.) bestimmt.

4.1.1.4 Restriktionsverdau

Beim Schneiden von Plasmiden mit Restriktionsendonukleasen wurden folgende Ansätze standardweise verwendet:

Zum Kontrollrestriktionsverdau (Kontrolle der Schnittstellen und Kontrolle der Länge der entstandenen Fragmente) wurde folgender Ansatz verwendet:

1 µg Plasmid DNA (alternativ: 6 µl des Plasmides der Mini-Präparation)

2 µl 10x-Puffer
0,3 µl Restriktionsendonuklease
Ad 20 µl mit H₂O

Zur Präparation von geschnittenen Plasmidfragmenten wurde folgender Ansatz verwendet:

10 µg Plasmid DNA
10 µl 10x-Puffer
1 µl Restriktionsendonuklease
Ad 100 µl mit H₂O

Die Reaktionen wurden 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Der Puffer wurde nach Herstellerangaben passend zu der jeweiligen Restriktionsendonuklease gewählt.

4.1.1.5 Phenol/Chloroform-Extraktion

Zur Reinigung von mit Proteinen oder anderen Substanzen verunreinigter DNA wurde diese 1 : 1 mit Phenol/Chloroform versetzt. (Der Restriktionsverdauansatz wurde zur besseren Handhabbarkeit von 100 µl mit H₂O auf 200 µl erweitert.) Nach gutem Durchmischen wurde der Ansatz für 5 min bei 13.000 U/min (Heraeus Biofuge pico - Haeraeus Instruments - DJB Labcare Ltd.) zentrifugiert. Die sich dadurch abtrennende wässrige Phase, in der sich die DNA befindet, wurde von der aliphatischen/organischen Phase abpipettiert. Die im wässrigen Überstand befindliche DNA wurde abgenommen und überführt.

4.1.1.6 Ethanolpräzipitation

Zur Fällung der DNA wurde ein Zehntel ihres Volumens 7 M Ammoniumacetat und das dreifache Volumen 96% Ethanol hinzugefügt. Zur Sedimentation der Nucleinsäuren wurde der Ansatz für 20 min bei 4°C mit 13.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das DNA-Pellet wurde mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen und erneut für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das DNA-Präzipitat im Vakuumtrockner (Savant Universal Vacuum System Plus, UVS400A - Thermo Fisher Scientific Inc.) getrocknet. Anschließend wurde es in passenden Volumina H₂O resuspendiert und bei Bedarf die Konzentration im Photospektrometer Ultrospec 3000 (Amersham Pharmacia Biotech UK Ltd.) bestimmt.

4.1.1.7 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Trennung z.B. von geschnittenen Plasmiden wurde Agarose-Gelelektrophorese in 0,5-2% Agarose mit 100-120 V unter Verwendung von DNA-Längenstandard 1kb DNA Ladder (250 b bis 10 kb) (Fermentas) verwendet. Als Laufpuffer wurde 0,5 TBE Puffer verwendet. Die Proben wurden 1 : 6 mit 6x-DNA-Ladepuffer (Fermentas) gemischt und in die Gel-taschen pipettiert. Durch Zugabe von Ethidiumbromid (3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenyl-phenanthridiniumbromid) zum Agarosegel konnte die gesuchte cDNA mittels UV-Licht (300 nm) angeregter Fluoreszenz (Agarosegel-Dokumentation, BioRad, GeldDoc 2000) lokalisiert werden. Bei Bedarf wurde die cDNA aus dem entsprechenden Stück Agarosegel mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN GmbH) nach Herstellerangaben extrahiert.

5x-Laufpuffer (TBE)

54,45 g Tris

27,5 g Borsäure

4,65 g EDTA

ad 1 l H₂O

Agarosegel-Laufpuffer

0,5x-TBE-Puffer

Agarosegel

0,5x-TBE-Puffer

0,5%-2% Agarose

1 µl Ethidiumbromid

4.1.1.8 Ligation

Für die Ligation wurden die geschnittenen Vektoren mit 1 µl Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIAP) (Fermentas) für 30 min bei 37°C am 5'-Ende dephosphoryliert, bevor sie über ein Gel getrennt wurden.

Die Mengen an Vektor und Insert wurden anhand der Bandenstärke auf Agarosegel abgeschätzt und im Verhältnis 3 : 1 Insert zu Vektor für die Ligation eingesetzt. Folgender Ansatz wurde für die Ligation verwendet und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert:

x µl Vektor-DNA

x µl Insert

1 µl Puffer (ATP-haltig)
ad 9 µl mit H₂O
+ 1 µl T4 DNA Ligase

Zur Beurteilung der Religation des Vektors wurde ein nur den Vektor enthaltender Ansatz als Negativkontrolle pipettiert. Der Ligationsansatz (10 µl) wurde zur Vermehrung des gewünschten Zielplasmides wie oben beschrieben in kompetente XL1-Blue *E. coli* transformiert. Die transformierten Bakterien wurden auf LB-Agar Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen. Nach Inkubation bei 37°C über Nacht wurden einzelne Kolonien aufgenommen und in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum vermehrt. Die Plasmide wurden wie oben beschrieben mittels DNA-Präparations Kit gereinigt und durch Kontrollrestriktionsverdau mit passenden Restriktionsendonukleasen oder Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) überprüft.

4.1.1.9 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Folgendes Pipettierschema wurde standardmäßig verwendet:

10 ng Matrizen-DNA
0,5 µl 5' Primer (100 pmol/µl = µM)
0,5 µl 3' Primer (100 pmol/µl = µM)
1 µl dNTP-Mixtur (10 mM)
5 µl 10x-Taq-Puffer
4 µl MgCl₂ (25 mM)
ad 49 µl H₂O

Das Gemisch wurde für 5 min auf Eis gekühlt, bevor dann

1 µl Taq (1 U/µl)

hinzugegeben wurde.

Folgendes Programm wurde standardmäßig verwendet (Robocycler Gradient 96 - Stratagene):

Start mit:

2 min bei 95°C

30 Zyklen mit:

1 min bei 95°C

1 min bei 55°C (Kontroll-PCR: 52°C)

1 min bei 72°C

Abschluss:

5 min bei 72°C

Danach Aufbewahrung bei 4°C.

4.1.1.10 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierungen wurden von der Firma SeqLab (Göttingen, D) durchgeführt. Die versandten Proben wurden nach den Anforderungen des Dienstleisters zusammenpipettiert.

4.1.2 Klonierungsstrategien der Expressionsplasmide für *E. coli* und *Nicotiana tabacum*

4.1.2.1.1 Klonierung von pet23a(+)-pelB-anti-hTNF-VHH-myc-his und pet23a(+)-pelB-anti-hTNF-VHH-Stag-myc-his für Expression von ^{Ec}anti-hTNF-VHH und ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag in *E. coli*

Die cDNA des gegen humanes TNF (hTNF) gerichteten Nanobodies anti-hTNF-VHH wurde von Geneart (München, D) synthetisiert (pCRScript-anti-hTNF-VHH). Die Aminosäuresequenz des Nanobodies stammt aus dem Patent der Firma Ablynx N.V. (Ghent-Zwijnaarde, Belgien) (VHH#3E Seq ID No 4 – WT, Patent Nr. US20070077249A1) (Silence *et al.* 2007). Das Plasmid pCRScript-anti-hTNF-VHH wurde mittels Hitzeschocktransformation in *E. coli* XL1 blue vermehrt und mit dem Nucleobond®AX-Kit (Machery-Nagel) gereinigt. Die cDNA des Nanobodies wurde mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *NotI* ausgeschnitten und durch Agaroseelektrophorese von dem Vektor getrennt. Die mit einem QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN GmbH) gereinigte cDNA für anti-hTNF-VHH wurde in das *E. coli* Expressionsplasmid pet23a(+)-pelB-IL-6-myc-his (unveröffentlichte Ergebnisse) anstelle der Interleukin 6 (IL-6) cDNA eingefügt. Dafür war dieses ebenfalls mit *NcoI* und *NotI* geschnitten und dephosphoryliert worden. Der gereinigte Vektor des *E. coli* Expressionsplasmides wurde mit dem Insert der anti-hTNF-VHH cDNA ligiert. Das entstandene Plasmid wurde pet23a(+)-pelB-anti-hTNF-VHH-myc-his genannt.

Die cDNA für das Ribonuklease S-tag Peptid inklusive einer kurzen Protein-linker-Sequenz wurde von Geneart (München, D) synthetisiert (pCRScript-IL-27-linker). Die Sequenz wurde mittels PCR mit Primern, die jeweils am 5'-Ende *NotI*-Endonuklease-

Restriktionsschnittstellen enthielten, amplifiziert (5' primer: 5'-3': CTG AGC GCG GCC GCA CTC GAG GTC GAC und 3'primer: 5'-3': CTG AGC GGC CGC GGA GCC GGA GTC CAT GTG). Auf diese Weise wurde der *S-tag* Sequenz an beiden Enden eine *Not I* Endonuklease Restriktionsschnittstelle angehängt. Nach Kontrolle mittels Agarose-Gelelektrophorese und Reinigung aus dem Agarosegel wurde das Amplifikat mit *NotI* geschnitten. Das gereinigte PCR-Produkt wurde mit dem ebenfalls mit *NotI* geschnittenen und dephosphorylierten pet23a(+)-pelB-anti-hTNF-VHH-myc-his ligiert. Das neue Plasmid wurde als pet23a(+)-pelB-anti-hTNF-VHH-Stag-myc-his bezeichnet.

Die richtige Orientierung und Anzahl der *S-tag* cDNA wurde über eine Kontroll-PCR (5'-Primer 5' Stag: 5'-CTG AGC GCG GCC GCA CTC GAG GTC GAC-3' und 3'Primer T7-Terminator: 5'-CTA GTT ATT GCT CAG CGG-3') sowie Sequenzierung der gesamten Protein-cDNA mit dem T7-Terminator Primer von C-terminal überprüft. (Daten nicht gezeigt.) Die Sequenzierung wurde von Seqlab (Göttingen, D) durchgeführt.

4.1.2.2 Klonierung von pet23a(+)-pelB-anti-hTNF-VHH-100xELP-myc-his für Expression von ^{Ec}anti-hTNF-VHH-100xELP in *E. coli*

Das Plasmid pet23a(+)-pelB-anti-hTNF-VHH-myc-his wurde mit *NotI* geschnitten, dephosphoryliert und gereinigt. Die 100xELP Sequenz aus pRTRA7/3-SO1-100xELP (Scheller *et al.* 2004) wurde ebenfalls mit *NotI* geschnitten und das gesuchte Fragment über Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion gereinigt. Anschließend wurde die Ligation der beiden Fragmente durchgeführt. Die korrekte Orientierung des 100xELP-Fragments in pet23a(+)-pelB-anti-hTNF-VHH-100xELP-myc-his wurde mittels Kontrollrestriktionsverdau mit *BglII* überprüft (siehe 5.2.1.1 S. 62).

4.1.2.3 Klonierung von pCB301-Kan-35S-LeB4-anti-hTNF-VHH-myc-KDEL und pCB301-Kan-35S-LeB4-anti-hTNF-VHH-100xELP-myc-KDEL für Expression von ^{Nt}anti-hTNF-VHH und ^{Nt}anti-hTNF-VHH-100xELP in *Nicotiana tabacum*

Die cDNA des anti-hTNF-VHH wurde über *BamHI* und *NaeI* aus pCRScript-anti-hTNF-VHH ausgeschnitten und über Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion gereinigt. Die Vektoren pRTRA7/3-SM12 (Artsaenko *et al.* 1995; Scheller *et al.* 2001) und pRTRA7/3-SO1-100xELP (Scheller *et al.* 2004) wurden ebenfalls mit *BamHI* und *NaeI* geschnitten, dephosphoryliert und der Vektoranteil wie oben gereinigt. Das anti-hTNF-VHH Insert wurde in die pRTRA7/3 Vektoren mit und ohne 100xELP-Sequenz ligiert. Die resultierenden

Plasmide wurden pRTRA7/3-35S-LeB4-anti-hTNF-VHH-myc-KDEL und pRTRA7/3-35S-LeB4-anti-hTNF-VHH-100xELP-myc-KDEL genannt.

Aus diesen Vektoren wurde die gesamte Tabakpflanzenexpressionskassette mit *HindIII* ausgeschnitten und gereinigt und in den ebenfalls mit *HindIII* geschnittenen und dephosphorylierten Vektor pCB301-Kan (Xiang *et al.* 1999; Gahrtz und Conrad 2009b) ligiert. Die Resultate wurden pCB301-Kan-35S-LeB4-anti-hTNF-VHH-myc-KDEL und pCB301-Kan-35S-LeB4-anti-hTNF-VHH-100xELP-myc-KDEL getauft.

4.1.3 Biochemische Methoden

4.1.3.1 Proteine

Rekombinantes hTNF wurde uns freundlicherweise von Daniela N. Maennel, Abteilung Immunologie an der Universität Regensburg, Deutschland, überlassen und wurde bei minus 80°C gelagert. anti-c-myc Antikörper stammen von Cell Signaling, New England Biolabs (Schwalbach, D), anti-PARP Antikörper von Cell Signaling (Beverly, MA, USA) und der sekundäre Antikörper anti-mouse IgG-horseradish peroxidase (Schaf) von Amersham Biosciences UK-Limited (Little Chalfont, UK). Etanercept (Enbrel[®] TM) stammt von Wyeth Pharma (Münster, D). MTG Transglutaminase wurde von N-zyme (Darmstadt, D) gekauft.

Die rekombinanten Nanobodies ^{Ec}anti-hTNF-VHH, ^{Nt}anti-hTNF-VHH, ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag (Mono-, Di- und Multimere), ^{Ec}anti-hTNF-VHH-100xELP, ^{Nt}anti-hTNF-VHH-100xELP wurden bei minus 20°C gelagert. Für die Experimente wurde, soweit nicht anderweitig erwähnt, das vollständig gereinigte Protein aus *E. coli* in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH=7,5 verwendet.

Di- und multimeres ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag wurde nach Dimerisierung über Größenausschlusschromatographie getrennt und für vergleichende Experimente genommen. Monomeres ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag stammt nicht aus den MTG Dimerisierungsreaktionen – für vergleichende Experimente wurde nur Protein ohne Kontakt zu MTG verwendet.

Die rekombinanten Proteine ^{Nt}anti-hTNF-VHH und ^{Nt}anti-hTNF-VHH-100xELP aus der Pflanzenexpression befanden sich in 50 mM Tris-HCl, pH=9,0.

4.1.3.2 Berechnung der Proteinmassen

Die Proteinmassen der rekombinanten Proteine wurden mithilfe des PROTEIN CALCULATOR v3.3 (Putnam 2006) berechnet.

4.1.3.3 Umpufferung von Proteinen

Die Umpufferung von Proteinen wurde mittels Größenausschlusschromatographie auf NAP-25 Säulen (Amersham Biosciences) durchgeführt. Die Säulen wurden mit 25 ml des Zielpuffers äquilibriert. Anschließend wurden 2,5 ml des umzupuffernden Proteins auf die Säule aufgetragen und das Protein wurde mit 3,5 ml des Zielpuffers eluiert.

4.1.3.4 Konzentrierung von Proteinen durch Ultrafiltration

Um die Konzentration von Proteinproben zu erhöhen, wurden sie bei 4°C in Vivaspin 20 ml Concentrator (Vivascience AG) zentrifugiert, bis die gewünschte Konzentration erreicht wurde. Die Proteinkonzentration wurde mit dem Ultrospec 3000 (Amersham Pharmacia Biotech UK Ltd.) bestimmt.

4.1.3.5 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die Trennung der Proteine nach Größe mittels SDS-PAGE wurde denaturierend und reduzierend durchgeführt, so dass die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine keine Rolle spielt und eventuelle Disulfidbrückenbindungen aufgelöst werden.

Für die SDS-PAGE wurden die Proben mit 4x-Lämmli-puffer versetzt und anschließend bei 95°C für 5 min aufgeköcht.

Die Trennung erfolgte in 4%-igem Sammelgel und 10-15%-igem Trenngel und wurde mit 160-180 Volt in 1x-Elektrophorese/SDS-PAGE-Puffer in einer BioRad Mini-Protean 3 Electrophoresis Cell (Bio-Rad Laboratories Inc.) durchgeführt. Je nach gewünschter Proteinzielgröße wurden unterschiedliche Zeiten verwendet, zumindest aber wurde immer gewartet, bis der im Probenpuffer enthaltene Farbstoff (Bromphenolblau) aus dem Gel austrat. Es wurden zwei Molekülmassenstandards für SDS-Gelelektrophorese verwendet:

Prestained Protein Molecular Marker (20 - 118 kDa) (Fermentas)

Unstained Protein Molecular Marker (14.4 - 116 kDa) (Fermentas)

SDS-Proteingele

10x-SDS-PAGE-Puffer (für 1 l)

1,92 M Glycin (144 g)

0,25 M Tris-Base (30 g)

1% SDS (10 g)

Trenngel 10% pH=8,8 (3-fache Menge)

3,87 ml *Aqua dest.*

2,55 ml 1.5 M Tris, pH 8,8

3,3 ml Polyacrylamid

	100 µl SDS 10%
	100 µl APS
	10 µl TEMED
4x-SDS-Probenpuffer (Lämmli)	Trenngel 15% (3-fache Menge)
38 ml <i>Aqua dest.</i>	2,25 ml <i>Aqua dest.</i>
10 ml 0,5M Tris/HCl, pH 6,8	2,55 ml 1,5 M Tris, pH 8,8
8 ml Glycerin	4,95 ml Polyacrylamid
16 ml SDS (10%)	100 µl SDS 10%
4 ml Bromphenolblau (1%)	100 µl APS
4 ml 2-Mercaptoethanol	10 µl TEMED

Sammelgel 4% pH=6,8 (2-fache Menge)

3,725 ml *Aqua dest.*
 0,625 ml 0,5 M Tris, pH 6,8
 0,67 ml Polyacrylamid
 50 µl 10% SDS
 25 µl APS
 5 µl TEMED

4.1.3.6 Coomassie-Färbung von Proteinen

Die in der SDS-PAGE getrennten Proteine wurden durch Färbung mit Coomassie Brilliant Blue sichtbar gemacht. Die Gele wurden 20-30 min in Coomassie-Färbelösung geschwenkt. Anschließend wurden sie solange in Entfärbelösung geschwenkt, bis die Hintergrundfärbung weitgehend verschwunden war und die Proteinbanden sich deutlich abhoben.

Coomassie-Lösung

50% Methanol
 10% Essigsäure
 0.1% Coomassie Blau G 250

Entfärbelösung

50% Methanol
 10% Essigsäure

4.1.3.7 Western Blotting und indirekte Immundetektion

Auf einem SDS-PAGE Gel getrennte Proteine werden mittels einer „semi-dry electroblotting“ Prozedur (Western-Blot, Trans-Blot SD, Semi-Dry Transfer Cell - BioRad) auf eine Polyvinylidendifluorid(PVDF)-Membran (Hybond-P - Amersham Biosciences) übertragen

(20 V für ca. 60 min). Die PVDF Membran wurde zur Vorbereitung dafür zuvor je 2 min in Methanol, H₂O sowie Transferpuffer geschwenkt. Anschließend wurde sie zwischen je 4 Lagen in Transferpuffer getränktem WhatmanTM Chromatography Papier (GE Healthcare - Whatman GmbH) in der Semi-Dry Transfer Zelle direkt auf das SDS-PAGE Gel gelegt.

Nach dem Übertragen der Proteine auf die PVDF-Membran wurde diese in Tris-Buffer Saline (TBS) Puffer (10 mM Tris, pH 8, 150 mM NaCl) mit 0,02% Tween-20 und 6% „skimmed milk powder“ geblockt.

Zum Nachweis der gesuchten Proteine wurden entsprechende primäre Antikörper über Nacht bei 4°C auf die PVDF-Membran gegeben. Nach mehrfachen Waschschritten mit TBS-Puffer mit 0,02% Tween-20 wurde der mit Meerrettich Peroxidase konjugierte sekundäre Antikörper anti-Maus IgG Meerrettich Peroxidase (Schaf) (Amersham Biosciences UK-Ltd) 1:10000 für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf die PVDF-Membran gegeben. Immunreaktive Proteine wurden mittels eines Chemilumineszenz Kits (ECL plus Western Blotting Detection System - Amersham Biosciences) den Anweisungen des Herstellers folgend nachgewiesen.

Zum Nachweis von poly ADP-ribose polymerase (PARP) oder seinen geschnittenen Derivaten (cleaved PARP, c-PARP) wurde der anti-PARP Antikörper (1:2000) von Cell signaling (Beverly, MA) als primärer Antikörper verwendet.

Um die rekombinanten *Nanobody*-Fusionsproteine zu detektieren, wurde der monoklonale Antikörper anti-c-myc 9E10 (Arbeitsgruppe Phytoantikörper, IPK Gatersleben) in passender Verdünnung als primärer Antikörper verwendet.

10x-Transferpuffer

250 mM Tris-HCl

2M Glycin

1x-Transferpuffer

200 ml Methanol

100 ml 10x Transferpuffer

700 ml H₂O

Tris-Buffer Saline (TBS) Puffer

10 mM Tris, pH 8

150 mM NaCl

TBS-T 0,02%

TBS mit 0,02% Tween-20

4.1.3.8 IPTG induzierte Proteinexpression in Bakterien

Die gewünschten Expressionsplasmide wurden durch Hitzeschock in den *E. coli* Stamm BL21 pLysS transformiert. Proteinexpression wurde bei einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 durch Zugabe von IPTG ad 1 mM induziert. Die Expression erfolgte für 18 Stunden bei 30°C. Anschließend wurden die Bakterien vom Zellkulturüberstand durch Zentrifugation (8°C mit 4000 U/min für 10 min, Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Zentrifuge - DuPont Instruments) abgetrennt und der Zellkulturüberstand bei minus 20°C eingefroren bzw. sofort weiter verarbeitet.

4.1.3.9 Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie mit Ni-NTA Agarose

Der bakterielle Expressionsüberstand wurde 1 : 1 mit 500 mM NaCl / 50 mM Phosphatpuffer pH 7,4 verdünnt. Pro Liter Zellkulturüberstand-Salz/Phosphatpuffer-Gemisch wurden 1 ml Ni-NTA Agarose hinzugefügt und unter leichtem Rühren bei 4°C für mindestens 2 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Ni-NTA Agarose durch Filtersäulen vom Zellkulturüberstand separiert. Um das Protein von der sich auf den Filtersäulen befindlichen Ni-NTA zu eluieren, wurde diese mehrfach mit 5 ml 500 mM Imidazol in 500 mM NaCl / 50 mM Phosphatpuffer pH 7,4 beschickt. Die Elutionsfraktionen wurden per Coomassiegefärbtem SDS-PAGE Gel überprüft, gesammelt und bei minus 20°C eingefroren bzw. sofort weiter verarbeitet. Die Reinigung mit Ni-NTA Agarose Affinitätschromatographie wurde mit jedem Zellkulturüberstand mehrfach wiederholt.

Die Reinigung des ^{Ec}anti-hTNF-VHH-100xELP wurde im Gegensatz zu ^{Ec}anti-hTNF-VHH und ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag nur in kleinem Maßstab durchgeführt. Sie erfolgte durch dreifache Beschickung von 1 ml Ni-NTA enthaltenden Filtersäulen mit dem Gemisch aus Expressionsüberstand und Phosphatpuffer. Die Proteine wurden wie beschrieben eluiert.

4.1.3.10 Größenausschlusschromatographie

4.1.3.10.1 Reinigung von Proteinen

Die mittels Ni-NTA Agarose Affinitätschromatographie gereinigten rekombinanten Proteine (^{Ec}anti-hTNF-VHH und ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag) wurden zur weiteren Reinigung mittels Größenausschlusschromatographie auf HiLoad 16/60 Superdex 75 prep grade Säulen (GE Healthcare) bei einer konstanten Flussrate von 1 ml/min getrennt. Dafür wurden die

Elutionsfraktionen der Ni-NTA konzentriert (ca. Faktor 2-5) und in Volumina bis maximal 1 ml auf die Gelfiltrationssäulen aufgetragen.

In ersten Reinigungen wurden die rekombinanten Proteine aus dem Elutionspuffer in 500 mM NaCl / 50 mM Phosphatpuffer pH=7,4 umgepuffert und dieser 0,55M Puffer als Laufpuffer verwendet (Abb. 5-3).

Zur Produktion größerer Proteinmengen wurden dann die Elutionsfraktionen (500 mM Imidazol in 500 mM NaCl / 50 mM Phosphatpuffer pH=7,4) von der Ni-NTA Affinitätschromatographie direkt auf die Säulen aufgetragen und in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH=7,5 als Laufpuffer getrennt (Abb. 5-4). 10 mM Natriumphosphatpuffer pH=7,5 wurde auch zur Trennung mono-, di- und multimerer ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag Proteine verwendet (Abb. 5-10).

Die Säulen wurden kalibriert mit dem „low molecular mass standard“ (Amersham Biosciences) mit Blue Dextran 2000 (2000 kDa), bovinem Serum Albumin (67 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Chymotrypsinogen A (25 kDa) und Ribonuklease A (13,7 kDa). Fraktionen von 2,5 ml wurden mittels Coomassie-gefärbten SDS-PAGE Gelen überprüft, entsprechende vereinigt und aufkonzentriert. Die Lagerung des Proteins erfolgte bei minus 20°C.

Die Reinheit des Proteins wurde mittels Coomassie-gefärbtem SDS-PAGE Gel und anhand der UV-Spektren (Ultrospec 3000 - Amersham Pharmacia Biotech UK Ltd.) überprüft (Abb. 5-4).

4.1.3.10.2 Untersuchung von Komplexen aus hTNF und *Nanobody*

Zur Untersuchung von Komplexen aus hTNF und ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag wurde 150 mM NaCl / 10 mM Natriumphosphatpuffer pH=7,5 als Laufpuffer verwendet, um ein bei 10 mM Puffer stattfindendes Verbleiben von hTNF auf der Gelfiltrationssäule zu verhindern.

Zuerst wurden 200 µg hTNF und 175 µg ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag getrennt auf der Säule analysiert. Zur Analyse des Komplexes von hTNF und ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag wurden 525 µg hTNF und 175 µg ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag in 1 ml Laufpuffer für 30 min bei 4°C vorinkubiert, bevor das Gemisch auf die Säule aufgetragen wurde.

Die Säule wurde unter gleichen Bedingungen mit dem „low molecular mass standard“ (Amersham Biosciences) mit Blue Dextran 2000 (2000 kDa), Bovinem Serum Albumin (67 kDa; ±10%), Ovalbumin (43 kDa; ±15%) und Chymotrypsinogen A (25 kDa; ±25%)

kalibriert. Zur Kontrolle der Fraktionen wurden diese in gleichen Mengen auf ein Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE Gel aufgetragen.

4.1.3.10.3 Größenberechnung der Proteine

Zur Berechnung der Proteingrößen anhand der Größenausschlusschromatographie wurde der Quotient aus Elutionsvolumen des Proteins (V_e) zum Ausschussvolumen der Säule (V_0) (ermittelt durch Blue Dextran - s.o.) bestimmt. Aufgrund der negativ linearen Korrelation mit dem Logarithmus der Molekülmasse wurde anhand einer mittels „low molecular mass standard“ (Amersham Biosciences) erstellten Regressionsgeraden (Y-Achse: V_e / V_0 , x-Achse: logarithmische Auftragung der Molekülmasse) die Masse der Proteine berechnet.

4.1.3.11 MALDI-TOF (*Matrix-assisted laser desorption ionization – time of flight*) Massenspektrometrie

Die rekombinanten Proteine wurden mittels ZipTip C₁₈ Pipettenspitzen (Millipore) gereinigt. (Die ZipTip Pipettenspitzen wurden zuerst je zwei Mal mit 100% Acetonitril und 0,1% Trifluoressigsäure gespült. Danach wurde das Trägermaterial durch 15-maliges Auf- und Abziehen der Probelösung mit Protein beladen. Nach einem dreimaligen Waschschrift mit 5% Methanol in 0,1% Trifluoressigsäure wurde das Protein in 5 µl 0,1% Trifluoressigsäure in 50% Acetonitril eluiert.)

Die Massenspektrometrie wurde freundlicherweise von Dr. Christoph Gelhaus (Zoologisches Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Massenspektrometrie) durchgeführt (Proteomics Analyzer 4700 (MALDI-TOF/TOF Massenspektrometer) - Applied Biosystems). Als Matrix wurde α -Cyano-4-hydroxymethylsäure verwendet.

4.1.3.12 *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA)

Microtitre Platten (Greiner Microlon) wurden mit rekombinantem hTNF (10 µg/ml – 100 µl pro Well) in PBS befüllt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach „Blocken“ mit 3% bovinem Serum Albumin (BSA) in PBS für 2 Stunden bei Raumtemperatur wurden unterschiedliche Konzentrationen der *Nanobody*-Varianten (^{Ec}anti-hTNF-VHH, mono-, di- und multimeres ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag und ^{Ec}anti-hTNF-VHH-100xELP) in 1% BSA PBS-T (+0.05% Tween-20) für eine Stunde bei Raumtemperatur hinzugefügt.

Gebundener *Nanobody* wurde über anti-c-myc Antikörper 1:100 in 1% BSA PBS-T, gefolgt von anti-Maus IgG Meerrettich Peroxidase (Schaf) (Amersham Biosciences UK-Ltd) 1:10000

verdünnt, in 1% BSA PBS-T nachgewiesen. Zwischen den einzelnen Schritten wurde jeweils mehrfach mit PBS oder PBS-T gewaschen. Die enzymatische Reaktion wurde mit 50 µl löslichem Peroxidasesubstrat (BM blue POD - Roche) bei Raumtemperatur für 5-30 min durchgeführt und mit 1 M H₂SO₄ (50 µl/well) gestoppt. Die Absorption wurde bei 450 nm an einem SLT Rainbow Plattenleser (Tecan) gemessen.

Bei dem vergleichenden ELISA von ^{Ec}anti-hTNF-VHH, ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag und ^{Ec}anti-hTNF-VHH-100xELP wurde, da es sich um erste vergleichende Experimente handelte, nur über Ni-NTA Agarose Affinitätschromatographie gereinigtes Protein verwendet. Die rekombinanten Proteine waren in 500 mM NaCl 50 mM Natriumphosphatpuffer pH=7,4 umgepuffert.

4.1.3.12.1 Kompetitiver ELISA

Mit hTNF beschichtete und mit BSA geblockte ELISA Microtitre Platten (Greiner Microton) wurden mit 25 ng/ml ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag in 1% BSA PBS-T (s.o.) für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag durch unterschiedliche Konzentrationen an Enbrel[®] TM (Wyeth Pharma) in 1% BSA PBS-T ersetzt, die für eine Stunde auf der Platte belassen wurden. Gebundener *Nanobody* wurde wie oben beschrieben quantifiziert.

4.1.3.13 Dimerisierung des S-tag Fusionsproteins ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag durch die Mikrobielle Transglutaminase (MTG)

Zur Findung optimaler Dimerisierungsverhältnisse von ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag durch MTG (N-zyme) wurden verschiedene Bedingungen zur Verknüpfung in MTG-Reaktionspuffer (10 mM Natriumphosphatpuffer pH=7,5) getestet (siehe 5.1.1.5.1 – S. 47). Die Reaktionsansätze wurden mittels Coomassie-gefärbten SDS-PAGE Gelen analysiert.

Für die Produktion größerer Mengen an dimerem Protein wurden Konzentrationen um 500 µg/ml ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag mit 0,01-0,02 U/ml MTG für ca. 15 Stunden bei 4°C inkubiert. Vor Trennung mittels Größenausschlusschromatographie wurden die Reaktionsansätze um Faktor 2-3 konzentriert. Multimere und Dimere wurden auf HiLoad 16/60 Superdex 75 prep grade Säulen in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH=7,5 Laufpuffer bei einem konstanten Fluss von 1 ml/min von den Monomeren getrennt. Die Trennung der Mono-, Di- und Multimere wurde mittels SDS-PAGE Gelelektrophorese überprüft.

4.1.4 Pflanzenbiochemische Methoden

Die pflanzenbiochemischen Methoden (Transformation, Selektion, Aufzucht und Überprüfung der Expression der Tabakpflanzen sowie die Reinigung der rekombinanten Proteine) wurden freundlicherweise von der AG Phytoantikörper von Priv.-Doz. Dr. Udo Conrad im Leibnitz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) in Gatersleben durchgeführt.

4.1.4.1 Transformation von Tabakpflanzen

Die Pflanzenexpressionsplasmide pCB301-Kan-35S-LeB4-anti-hTNF-VHH-myc-KDEL und pCB301-Kan-35S-LeB4-anti-hTNF-VHH-myc-100xELP-KDEL wurden durch Elektroporierung (Conrad *et al.* 1998) in *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 (pGV2260) (Deblaere *et al.* 1985) transferiert.

Eine erste Testung der Expression der rekombinanten Proteine in mittels Agroinfiltration (Gahrtz und Conrad 2009b) transient transfizierten Blattscheiben erfolgte im Lysat der Blätter über Western Blot gegen „c-myc“ (Munro und Pelham 1987) (monoklonaler Antikörper anti-c-myc 9E10 - AG Phytoantikörper, IPK Gatersleben) (Conrad *et al.* 1998).

Blattscheiben von *Nicotiana tabacum* cv. *SNN* wurden wie anderswo beschrieben (Zambryski *et al.* 1983; Horsch *et al.* 1985) mit Hilfe des transformierten *A. tumefaciens* transfiziert. Aus transfizierten Pflanzenzellen der Tabakpflanzenblattscheiben wurden auf “Murashige and Skoog (MS) medium” (AG Phytoantikörper, IPK Gatersleben) mit 50 mg/l Kanamycin Pflanzenkalli herangezüchtet und im Gewächshaus großgezogen. Zur Auswahl von stark exprimierenden transgenen Pflanzen wurde die Expression der rekombinanten Proteine in Blättern ebenfalls über Western Blot gegen „c-myc“ (monoklonaler Antikörper anti-c-myc 9E10 - AG Phytoantikörper, IPK Gatersleben) überprüft. (Für exakte Durchführung siehe: (Conrad *et al.* 1998; Gahrtz und Conrad 2009b)).

4.1.4.2 Reinigung der rekombinanten Pflanzenproteine

4.1.4.2.1 Reinigung von ^{Nt}anti-hTNF-VHH-100xELP durch *inverse transition cycling*

Zu 100 g gefrorenen Tabakblättern wurde 340 ml eisgekühltes 50 mM Tris-HCl pH 9.0 hinzugefügt und für 4 min in einem Mixer der Firma Blender homogenisiert. Anschließend wurde der Blattrohextrakt zum Abtrennen von unlöslichen Anteilen zentrifugiert. Zum Abtrennen von restlichen Zellbestandteilen wurde dem Überstand 0,87% NaCl hinzugefügt

und dieser für 15 min auf 60°C erhitzt und nach anschließender Kühlung im Eiswasserbad erneut für 20 min bei 4°C mit 5000 g zentrifugiert. Zur Ausfällung des rekombinanten ELP-Fusionsproteins wurde dem überführten Überstand NaCl ad 2M hinzugefügt und für 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das rekombinante Protein mit 16.000 g für 1 Stunde bei 37°C abzentrifugiert. Das Fusionsproteinpellet wurde in 4°C kaltem 50 mM Tris-HCl pH 9.0 gelöst und unlösliche Rückstände durch Zentrifugation für 1 Stunde mit 16.000 g bei 4°C abgetrennt. Die verschiedenen Reinigungsschritte wurden mittels Coomassie-gefärbtem SDS-PAGE Gel und Western Blot gegen „c-myc“ (Munro und Pelham 1987) (monoklonaler Antikörper anti-c-myc 9E10 - Arbeitsgruppe Phytoantikörper, IPK Gatersleben) kontrolliert (Conrad *et al.* 1998).

4.1.4.2.2 Reinigung von ^{Nt}anti-hTNF-VHH durch anti-c-myc Affinitätschromatographie

Die anti-c-myc Affinitätschromatographie-Säulen wurden selbst hergestellt und die Reinigung wie anderswo ausführlich beschrieben durchgeführt (Conrad *et al.* 1998).

Nach Reinigung wurde eine grobe erste Abschätzung der Konzentration der rekombinanten Proteine ^{Nt}anti-hTNF-VHH und ^{Nt}anti-hTNF-VHH-100xELP mittels Auftragung gegen ^{Ec}anti-hTNF-VHH auf ein Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE Gel durchgeführt.

Das gereinigte ^{Nt}anti-hTNF-VHH und ^{Nt}anti-hTNF-VHH-100xELP wurden bei minus 20°C gelagert.

4.1.5 Zellbiologische Methoden

4.1.5.1 Handhabung von Zellkulturen

Murine L929-Zellen und humane HEK 293 Zellen stammen von der „Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen“ (DSMZ). Die Zellen wurden in „DMEM high glucose culture medium“ (PAA Laboratories) mit 10% „fetal calf serum“, Penicillin (60 mg/l) und Streptomycin (100 mg/l) versetzt und bei 37°C mit 5% CO₂ in einer mit Wasser gesättigten Atmosphäre kultiviert (Brutschrank, HeraCell CO₂-Inkubator - Heraeus Instruments).

L929-Zellen sind adhärente Zellen, die auf Zellkulturpetrischalen (Sarstedt) kultiviert wurden. Bei Erreichen der Konfluenz wurden sie nach Waschen mit DMEM über eine kurze

Inkubation mit 0,25% Trypsin / 0,03% EDTA in DMEM von der Kulturschale abgelöst. Nach Zentrifugation bei 1000 g für 5 min und Waschen mit DMEM wurden die Zellen im Verhältnis 1:10 in DMEM subkultiviert.

4.1.5.2 Zytotoxizitätsassay mit hTNF auf murinen L929-Zellen

L929 Zellen wurden standardmäßig mit einer Dichte von 10000 Zellen pro well einer 96-well Platte (Sarstedt) für adhärenente Zellen ausgesät und für 24 Stunden bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Für eine Zytotoxizitätsreihe wurden die Zellen weitere 24 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen an hTNF im Brutschrank kultiviert.

Für die Zytotoxizitätsinhibitionsreihen wurden 100 ng/ml hTNF verwendet. Zusätzlich wurden unterschiedliche Konzentrationen an anti-hTNF-VHH Varianten hinzugefügt und das Gemisch für 30 min bei 37°C vorinkubiert. Zur Quantifizierung der zellulären Proliferation wurde der CellTiter-Blue Cell Viability Assay (Promega) den Instruktionen des Herstellers folgend angewendet und auf einem Lambda Fluoro 320 Fluorimeter (MWG Biotech, Ebersberg, D) (ex-filter 530/25, em-filter 590/35, sensitivity 75, Software KC4) die Fluoreszenz gemessen. Die maximalen Fluoreszenzwerte (560/590) schwankten zwischen 30,000 und 80,000 in Abhängigkeit von der Inkubationszeit für die Fluoreszenzentwicklung. Alle Bedingungen wurden in dreifacher Ausführung gemessen.

Zum Nachweis der Apoptoseauslösung auf Proteinebene mittels anti-PARP Western Blot wurden L929 Zellen mit einer Dichte von 500.000 Zellen pro well in 2 ml Medium auf einer 6-well Platte für adhärenente Zellen (Sarstedt) ausgesät und unter den oben beschriebenen Bedingungen inkubiert. (Es wurden Konzentrationen von 1 µg/ml und 100 ng/ml sowohl Monomer als auch Dimer bei 100 ng/ml hTNF gewählt. Außerdem wurde eine Positivkontrolle (ohne hTNF) und eine Negativkontrolle (100 ng/ml hTNF ohne hTNF blockierende Agenzien) erstellt.)

Zur Vorbereitung für den anti-PARP Western Blot wurden die L929-Zellen nach Entfernung des Mediums einmal mit PBS gewaschen und direkt in 2x Lämmli-Puffer lysiert. Die Proteinkonzentration wurde mittels eines BCA Protein Assays (Pierce Biotechnology) festgestellt. Je 10 µg Gesamtprotein wurden nach 5 min bei 95°C auf ein SDS-PAGE Gel aufgetragen und nach Größe getrennt. Die weiteren Schritte des Western Blots wurden wie unter 4.1.3.7 (S. 23) beschrieben durchgeführt.

4.1.5.3 Stimulationsassay mit hTNF auf humanen HEK293-Zellen

Die HEK293-Zellen Stimulationsassay Experimente wurden in Kooperation mit der AG von Prof. Dr. med. Philip Rosenstiel (Institut für Klinische Molekularbiologie, UKSH Kiel) durchgeführt.

Zur Quantifizierung der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B in HEK293 Zellen wurde ein Dual-Luziferase Reporter Assay (Promega), den Angaben des Herstellers folgend, verwendet.

Auf eine 96-well Platte ausgesäte Zellen wurden mit 15 ng/well an pNF- κ B Luc Plasmid (Stratagene) in Kombination mit 5 ng/well an pRL-TK (Promega) transfiziert. Die Zellen wurden mit 10 ng/ml hTNF für 6 Stunden stimuliert, nicht stimuliert bzw. die Stimulation durch Zugabe unterschiedlicher Mengen von monomerem und dimerem ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag inhibiert. Die Zelllysate wurden mit einem Tecan Genios Pro microplate luminometer (Tecan Trading AG) analysiert. Alle Bedingungen wurden in zweifacher Ausführung gemessen. Die Ergebnisse für die NF- κ B abhängige „Firefly Luziferase“ Aktivität wurden unter Gebrauch des Referenzplasmids normalisiert und in relativen Lichteinheiten (RLE) ausgegeben.

4.1.6 Tiermodell

4.1.6.1 Lipopolysaccharid (LPS) / D-Galaktosamin (D-Gal) Sepsismodell der Maus

LPS / D-Galaktosamin Toxizität wurde als Tiermodell der Sepsis in Mäusen verwendet. Die nur humanes TNF exprimierenden Mäuse wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Sergei Nedospasov (AG Entzündungsbiologie, Prof. Dr. Sergei Nedospasov, Deutsches Rheuma-Forschungszentrum Berlin) erzeugt. Durch Einbau eines den hTNF/LT Lokus enthaltenden Kosmids in das Mausgenom entstanden hTNF transgene Mäuse, die sowohl humanes als auch murines TNF (und LT) exprimieren (Galimov *et al.* 2008). Diese wurden mit mTNF/LT ^{-/-} Mäusen gekreuzt, welche kein murines TNF oder LT exprimieren. Die hTNF/LT tg mTNF/LT^{-/-} Mäuse exprimieren demzufolge nur humanes TNF und LT anstatt der murinen Proteine (Kuprash *et al.* 2002).

30 min nach intraperitonealer Gabe von LPS (10 μ g pro Maus) und D-Galaktosamin (20 mg pro Maus) wurden sterilfiltriertes monomeres oder dimeres ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag ebenfalls intraperitoneal appliziert. In hTNF/LT tg mTNF/LT^{-/-} Mäusen wurde 300 μ g pro Maus (Monomer oder Dimer) und in den als Wildtyp verwendeten C57Bl/6 Mäusen 500 μ g

Monomer pro Maus gespritzt. Das Überleben der Mäuse wurde für 24 Stunden beobachtet. Die Experimente wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Entzündungsbiologie von Prof. Dr. Sergei Nedospasov am Deutschen Rheuma-Forschungszentrum Berlin durchgeführt.

4.2 Materialien

4.2.1 Bakterienstämme

Agrobacterium tumefaciens C58C1 (pGV2260) (Deblaere *et al.* 1985)

E. coli XL1 blue (Stratagene, La Jolla, CA, USA)

E. coli BL 21 pLysS (Amersham Bioscience, Freiburg, D)

4.2.2 Säugerzelllinien

HEK 293 Zellen „Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
(DSMZ, Braunschweig, D)

Murine L929-Zellen Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
(DSMZ, Braunschweig, D)

4.2.3 Pflanzen

Nicotiana tabacum cv. Samsun NN (AG Phytoantikörper, Priv.-Doz. Dr. Udo Conrad, IPK
Gatersleben, D)

4.2.4 Tiere

C57Bl/6 Mäuse (AG Entzündungsbiologie, Prof. Dr. Sergei Nedospasov, Deutsches Rheuma-
Forschungszentrum Berlin, D)

hTNF/LT tg mTNF/LT^{-/-} Mäuse (Kuprash *et al.* 2002; Galimov *et al.* 2008)

4.2.5 Enzyme

Alle DNA-modifizierenden Enzyme mit den entsprechen Puffern und Supplementen wurden
von Fermentas (St. Leon-Rot, D) bezogen.

CIAP (*calf intestine alkaline phosphatase*)

Restriktionsenzyme: *Bam*HI, *Bgl*I, *Hind*III, *Nae*I, *Nco*I, *Not*I,

T4-DNA-Ligase

Taq-DNA Polymerase (inkl. MgCl₂ (25 mM), dNTP-Mixtur (10 mM))

Mikrobielle Transglutaminase (MTG)

N-zyme (Darmstadt, D).

Trypsin

Invitrogen - Life Technologies (NY, USA)

4.2.6 *Aqua bidestillata*

Als *Aqua bidestillata* wurde mittels Millipore MilliQ Plus - Ultra Pure Water System (Billerica, MA, USA) gereinigtes Wasser bezeichnet.

4.2.7 Antikörper

Etanercept (Enbrel[®] TM) Wyeth Pharma (Münster, D)

Primäre Antikörper:

anti-c-myc Antikörper Cell Signaling, New England Biolabs (Schwalbach, D)

anti-c-myc 9E10 mAb AG Phytoantikörper, IPK Gatersleben (Gatersleben, D)

anti-PARP Antikörper Cell signaling (Beverly, MA, USA).

Sekundäre Antikörper:

anti-mouse IgG-horseradish peroxidase (sheep)

Amersham Biosciences UK-Ltd (Little Chalfont, UK)

4.2.8 Proteinpräparationen

Rekombinantes hTNF Gabe von Daniela N. Maennel, Abteilung für Immunologie, Universität Regensburg, D

4.2.9 Medien und Seren

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High Glucose (4.5 g/ml)

PAA Laboratories (Marburg, D)

Fetales Kälberserum (FCS) PAA Laboratories (Marburg, D)

4.2.10 Antibiotika

Ampicillin (Natriumsalz) Roth (Karlsruhe, D)

Kanamycin (Sulfat) Roth (Karlsruhe, D)

Penicillin G (Natriumsalz) PAA Laboratories (Marburg, D)

Streptomycin (Sulfat) PAA Laboratories (Marburg, D)

4.2.11 Primer

Name	Sequenz 5'-3'
3' S-tag	CTGAGCGGCCGCGGAGCCGGAGTCCATGTG
5' S-tag	CTGAGCGCGGCCGCACTCGAGGTCGAC
T7-Terminator	CTAGTTATTGCTCAGCGG

4.2.12 Vektoren & Plasmide

pCRScript-anti-hTNF-VHH (Geneart, München, D)

pCRScript-IL-27-linker (Geneart, München, D)

pet23a(+)-pelB-IL-6-myc-his

pet23a(+)-pelB-anti-hTNF-VHH-myc-his

pet23a(+)-pelB-anti-hTNF-VHH-Stag-myc-his

pet23a(+)-pelB-anti-hTNF-VHH-ELP-myc-his

pRTRA7/3-SO1-100×ELP (Scheller *et al.* 2004)

pRTRA7/3-SM12 (Scheller *et al.* 2001)

pCB301-Kan Vektor (Xiang *et al.* 1999; Gahrtz und Conrad 2009b)

pRTRA7/3-35S-LeB4-anti-hTNF-VHH-myc-KDEL

pRTRA7/3-35S-LeB4-anti-hTNF-VHH-100xELP-myc-KDEL

pCB301-Kan-35S-LeB4-anti-hTNF-VHH-myc-KDEL

pCB301-Kan-35S-LeB4-anti-hTNF-VHH-myc-100xELP-KDEL

pNF-κB Luc Plasmid (Stratagene, La Jolla, CA, USA)

pRL-TK (Promega, Mannheim, D)

4.2.13 Längenstandards

DNA-Längenstandard für Agarose-Gelelektrophorese:

1kb DNA Ladder (250 b bis 10 kb) (Fermentas, St. Leon-Rot, D)

Molekülmassenstandard für SDS-Gelelektrophorese:

Prestained Protein Molecular Marker (20 - 118 kDa) (Fermentas, St. Leon-Rot, D)

Unstained Protein Molecular Marker (14.4 - 116 kDa) (Fermentas, St. Leon-Rot, D)

Kalibrierungsstandard für die Größenausschlusschromatographie:

LMW-Calibration Kit (Amersham Biosciences, Freiburg, D)

4.2.14 Sonstige gebrauchsfertige Agenzien(-mischungen) und Kits

6x-DNA-Ladepuffer (Fermentas, St. Leon-Rot, D)

BCA Protein Assay (Pierce Biotechnology, Rockford, USA)

Bradford Assay (BioRad, Hercules, CA, USA)

CellTiter-Blue Cell Viability Assay (Promega, Mannheim, D)

Chemilumineszenz Kit (ECL plus Western Blotting Detection System, Amersham Biosciences, Freiburg, D)

Dual-Luziferase Reporter Assay (Promega, Madison, WI, USA)

lösliches Peroxidasesubstrat (BM blue POD) (Roche, Mannheim, D)

Nucleobond®AX-Kit (Machery-Nagel, Düren, D)

QIAprep Spin MiniPrep Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, D)

QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, D)

4.2.15 Verbrauchsmaterialien

6-well Zellkulturplatte für adhärenente Zellen (Sarstedt, Nümbrecht, D)

96-well Zellkulturplatte für adhärenente Zellen (Sarstedt, Nümbrecht, D)

Bakterienschalen (Ø 10 cm) (Sarstedt, Nümbrecht, D)

Microtitre Platten (Greiner Microlon, Solingen, D)

Ni-NTA Agarose (QIAGEN GmbH, Hilden, D)

Polyvinylidendifluorid (PVDF) Membran (Hybond-P) (Amersham Biosciences, Freiburg, D)

Vivaspin 20 ml Concentrator (Vivascience AG, Hannover, D)

Whatman™ Chromatography Paper (GE Healthcare - Whatman GmbH, Dassel, D)

Zellkulturpetrischalen (Sarstedt, Nümbrecht, D)

ZipTip® Pipette Tips (Millipore, Billerica, MA, USA)

4.2.16 Vorgepackte Säulen

HiLoad 16/60 Superdex 75 prep grade Säulen (GE Healthcare, München, D)

NAP-25 Säulen (Amersham Biosciences, Freiburg, D)

4.2.17 Geräte

Agarosegel-Dokumentation BioRad GeldDoc 2000 (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)

ÄKTA FPLC / Explorer / Purifier mit UNICORN 5.11 Software (Amersham Pharmacia Biotech - GE Healthcare, München, D)

Autoklave HST 4x5x6 (Zirbus Technology, Bad Grund, D)

BioRad Power-Pac 200 & BioRad Power-Pac 300 (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)

BioRad Power Pac Basic (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)

BioRad Mini-Protean 3 Electrophoresis Cell (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)

Brutschrank, HeraCell CO₂-Inkubator (Heraeus Instruments - DJB Labcare Ltd, Newport Pagnell, England)

Heraeus Megafuge 1.0 (Heraeus Instruments - DJB Labcare Ltd, Newport Pagnell, England)

Inkubationsschüttler Certomat H (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D)

Innova 4000 incubation shaker (New Brunswick Scientific, CT, USA)

Lambda Fluoro 320 Fluorimeter, Software KC4 (MWG Biotech, Ebersberg, D)

Magnetrührer (Heidolph Instruments, Schwalbach, D)

Mikrobiologischer Brutschrank (Binder, Tuttlingen, D)

Mikroskop Olympus CKX41 mit Olympus DP71 Kamara mit Photosoftware Cell[^]B 2.6, Olympus Soft Imaging Solutions GmbH (Olympus, Hamburg, D)

Mixer (Blender, USA)

Nanodrop Spectrophotometer ND1000 mit Software ND1000 V3.5.2. Coleman Technologies Inc. (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D)

Proteomics Analyzer 4700 (MALDI-TOF/TOF Massenspektrometer), (Applied Biosystems, Framingham, USA)

Robocycler Gradient 96, Stratagene (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA)

SLT Rainbow Plate Reader (Tecan, Männedorf, Schweiz)

Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed centrifuge (DuPont Instruments, DE, USA)

Spektrophotometer Hitachi U-2001 (Uwe Binger Analytik, Schwäbisch Gmünd, D)

Spektrophotometer Ultrospec 3000 (Amersham Pharmacia Biotech UK Ltd., Little Chalfont, UK)

Sterilbank Gelaire BSB 6 (Gelaire, Sydney, Australia)

Tecan Genios Pro microplate luminometer (Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz)

Thermomixer (Eppendorf AG, Hamburg, D)

Thermostat 5320 (Eppendorf AG, Hamburg, D)

Tischzentrifuge 5415R (Eppendorf AG, Hamburg, D)

Tischzentrifuge Heraeus Biofuge pico (Haerus Instruments - DJB Labcare Ltd, Newport Pagnell, England)

UV-Transilluminator (Intas, Göttingen, D)

Vakuumtrockner Savant Universal Vacuum System Plus, UVS400A (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)

Vortex Genie 2 (Scientific Industries, NY, USA)

Western-Blot, Trans-Blot SD, Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)

Zentrifuge Jouan CR3i mit Rotor Jouan T40 (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA)

4.2.18 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden sofern nicht anders erwähnt bei folgenden Firmen erworben:

CARL ROTH GMBH + CO. KG (Karlsruhe, D)

Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

Merck (Darmstadt, D)

2-Mercaptoethanol

Acetonitril

Agar

Agarose

Ammoniumacetat

APS

Borsäure

bovines Serum Albumin (BSA)

Bromphenolblau

Chloroform

Coomassie Blau G 250

D-Galaktosamin

Di-Natriumhydrogenphosphat

Dithiothreitol

EDTA

Essigsäure
Ethanol (96%)
Ethidiumbromid
Glycerin
Glycin
H₂SO₄
Hefeextrakt
Imidazol
IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid), Omnilab AG (Mettmenstetten, Schweiz)
KCl
KH₂PO₄
LPS
Methanol
NaCl
Na₂HPO₄
NaH₂PO₄
Phenol
Polyacrylamid
SDS
„skimmed milk powder“
TEMED
Tris / Tris Base / Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)
Tris-HCl (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid)
Trypton/Pepton
Tween-20
Trifluoressigsäure

4.2.19 Sonstige Puffer

10x PBS

1,4 M NaCl	81,82 g NaCl
27 mM KCl	2,01 g KCl
100 mM Na ₂ HPO ₄	14,20 g Na ₂ HPO ₄

18 mM KH_2PO_4
ad 1 l *Aqua dest.*

2,45 g KH_2PO_4

5 Ergebnisse

5.1 Erzeugung dimerer Nanobodies mit erhöhter hTNF neutralisierender Aktivität mittels Mikrobieller Transglutaminase

5.1.1 Herstellung von ^{Ec}anti-hTNF-VHH, monomerem und dimerem ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag in *E. coli*

5.1.1.1 Klonierung von ^{Ec}anti-hTNF-VHH und ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag

Eine cDNA, die für den gegen humanes TNF (hTNF) gerichteten *Nanobody* anti-hTNF-VHH kodiert, wurde in das *E. coli* Expressionsplasmid pet23a(+) eingefügt. Die N-terminal angefügte „pelB leader“ Sequenz ist verantwortlich für die Abgabe des Proteins in den Zellkulturüberstand bei Expression (periplasmatische Expression). Sie wird durch eine

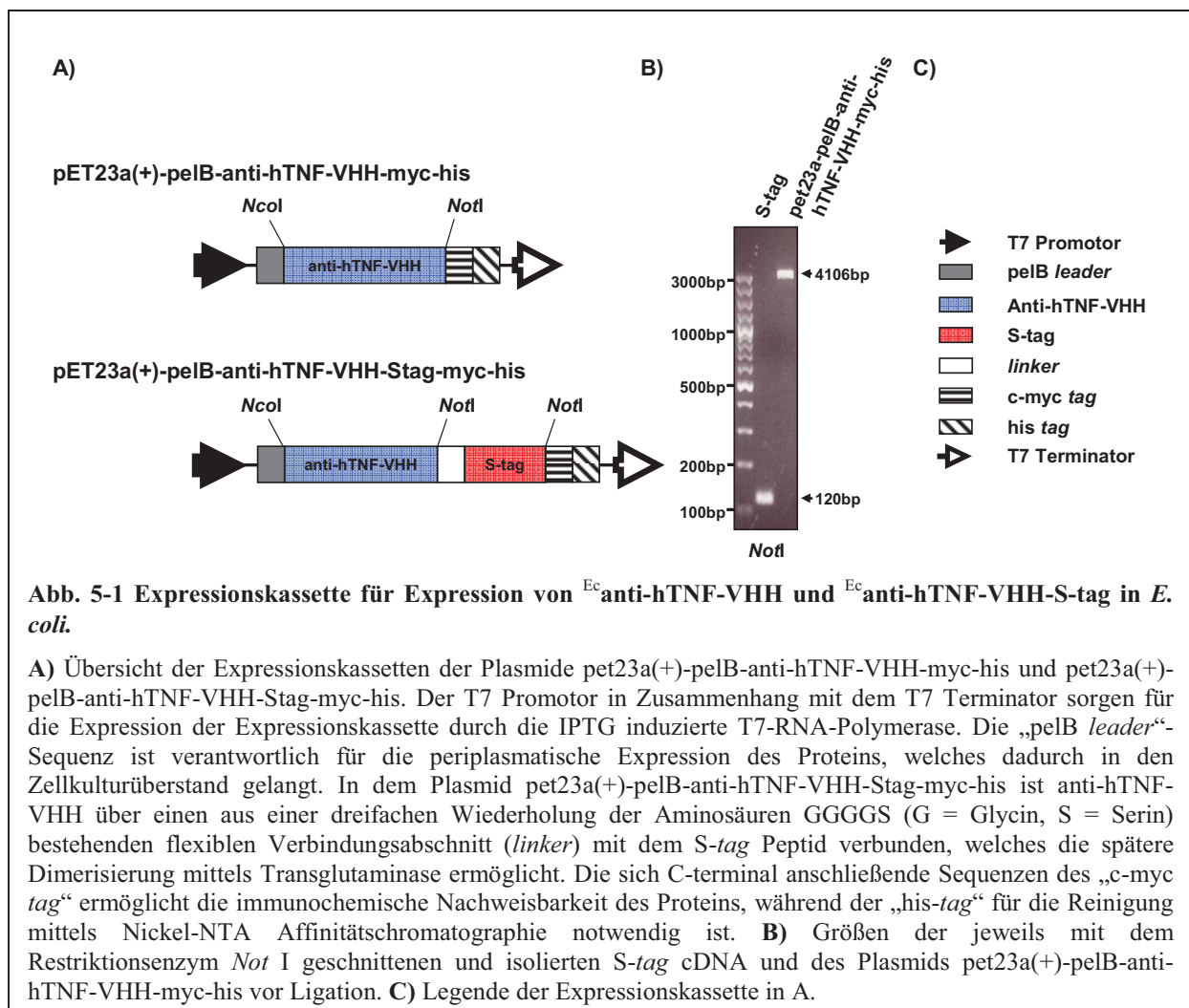


Abb. 5-1 Expressionskassette für Expression von ^{Ec}anti-hTNF-VHH und ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag in *E. coli*.

A) Übersicht der Expressionskassetten der Plasmide pet23a(+)-pelB-anti-hTNF-VHH-myc-his und pet23a(+)-pelB-anti-hTNF-VHH-Stag-myc-his. Der T7 Promotor in Zusammenhang mit dem T7 Terminator sorgen für die Expression der Expressionskassette durch die IPTG induzierte T7-RNA-Polymerase. Die „pelB leader“-Sequenz ist verantwortlich für die periplasmatische Expression des Proteins, welches dadurch in den Zellkulturüberstand gelangt. In dem Plasmid pet23a(+)-pelB-anti-hTNF-VHH-Stag-myc-his ist anti-hTNF-VHH über einen aus einer dreifachen Wiederholung der Aminosäuren GGGGS (G = Glycin, S = Serin) bestehenden flexiblen Verbindungsabschnitt (*linker*) mit dem S-tag Peptid verbunden, welches die spätere Dimerisierung mittels Transglutaminase ermöglicht. Die sich C-terminal anschließende Sequenzen des „c-myc tag“ ermöglicht die immunochemische Nachweisbarkeit des Proteins, während der „his-tag“ für die Reinigung mittels Nickel-NTA Affinitätschromatographie notwendig ist. **B)** Größen der jeweils mit dem Restriktionsenzym Not I geschnittenen und isolierten S-tag cDNA und des Plasmids pet23a(+)-pelB-anti-hTNF-VHH-myc-his vor Ligation. **C)** Legende der Expressionskassette in A.

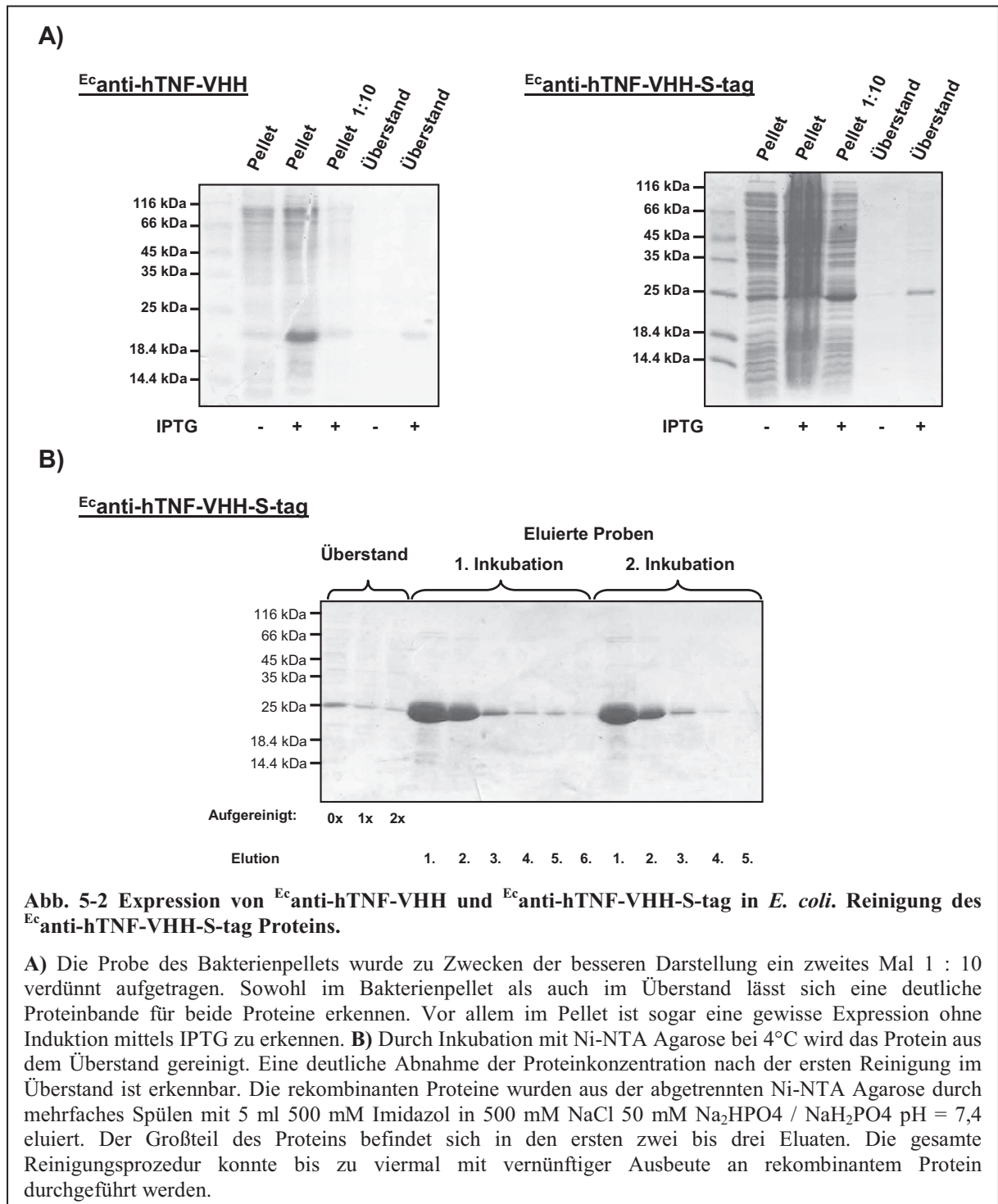
Signalpeptidase abgeschnitten, bevor das Protein in den periplasmatischen Raum zwischen der inneren und äußeren Zellmembran gramnegativer Bakterien entlassen wird, von wo es in den Zellkulturüberstand gelangt (vgl. zusammenfassend: (Hauser und Ryan 2007)). C-terminal befinden sich Sequenzen für einen „c-myc tag“ und einen „his-tag“. Der „c-myc tag“ funktioniert als Markierung für den immunochemischen Nachweis des Proteins (Munro und Pelham 1987). Der „his-tag“ ist notwendig für die spätere Reinigung mittels Nickel-NTA Affinitätschromatographie. Für die Erzeugung des dimerisierbaren ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag Proteins wurde C-terminal an die anti-hTNF-VHH cDNA die für das S-tag Peptid kodierende cDNA angeschlossen, die die spätere Dimerisierung mittels Transglutaminase ermöglicht (Kamiya *et al.* 2003b). Die cDNA verfügt zusätzlich über eine zwischen anti-hTNF-VHH und dem S-tag gelegene kurze verbindende Proteinsequenz, die den *Nanobody* flexibel mit dem S-tag verknüpft. Die fertigen Expressionskassetten sind in Abb. 5-1 dargestellt und wurden pet23a(+)-pelB-anti-hTNF-VHH-myc-his und pet23a(+)-pelB-anti-hTNF-VHH-S-tag-myc-his genannt.

5.1.1.2 Expression und Reinigung von ^{Ec}anti-hTNF-VHH und ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag per Nickel-NTA Affinitätschromatographie

Die Plasmide pet23a(+)-pelB-anti-hTNF-VHH-myc-his und pet23a(+)-pelB-anti-hTNF-VHH-S-tag-myc-his wurden in den *E. coli* Stamm BL21 pLysS transformiert und die Proteinexpression durch IPTG induziert. Im Coomassie-gefärbten SDS-PAGE Gel sind sowohl im abzentrifugierten Bakterienpellet als auch im Zellkulturüberstand deutliche Banden der Proteine ^{Ec}anti-hTNF-VHH und ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag zu erkennen. Selbst ohne Zugabe von IPTG ist vor allem im Pellet eine gewisse Expression des rekombinanten Proteins zu erkennen (Abb. 5-2 A).

^{Ec}anti-hTNF-VHH läuft auf einer geschätzten Höhe von 20 kDa (erwartet 17,3 kDa) und ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag bei knapp unter 25 kDa (erwartet 20,9 kDa). Durch die Reinigung der Proteine mittels Ni-NTA Affinitätschromatographie nimmt die Proteinkonzentration im Zellkulturüberstand vor allem durch die erste Inkubation mit Ni-NTA deutlich ab (Abb. 5-2 B). Allerdings befindet sich immer noch Protein im Zellkulturüberstand. Die Ausbeute an rekombinantem Protein nimmt bei wiederholter Inkubation mit Ni-NTA ab (Abb. 5-2 B). Die gesamte Reinigungsprozedur konnte bis zu viermal mit vernünftigem Ertrag an rekombinantem Protein durchgeführt werden.

Bei der Eluierung des Proteins von der Ni-NTA Agarose mit imidazolhaltigem Phosphatpuffer löste sich der Großteil bei den ersten zwei bis drei Auswaschvorgängen (vergleiche Abb. 5-2 B). Das eluierte Protein weist bereits einen hohen Reinheitsgrad auf.



5.1.1.3 Reinigung von E_c anti-hTNF-VHH und E_c anti-hTNF-VHH-S-tag mittels Größenausschlusschromatographie

E_c anti-hTNF-VHH und E_c anti-hTNF-VHH-S-tag Fraktionen von der Ni-NTA wurden mittels

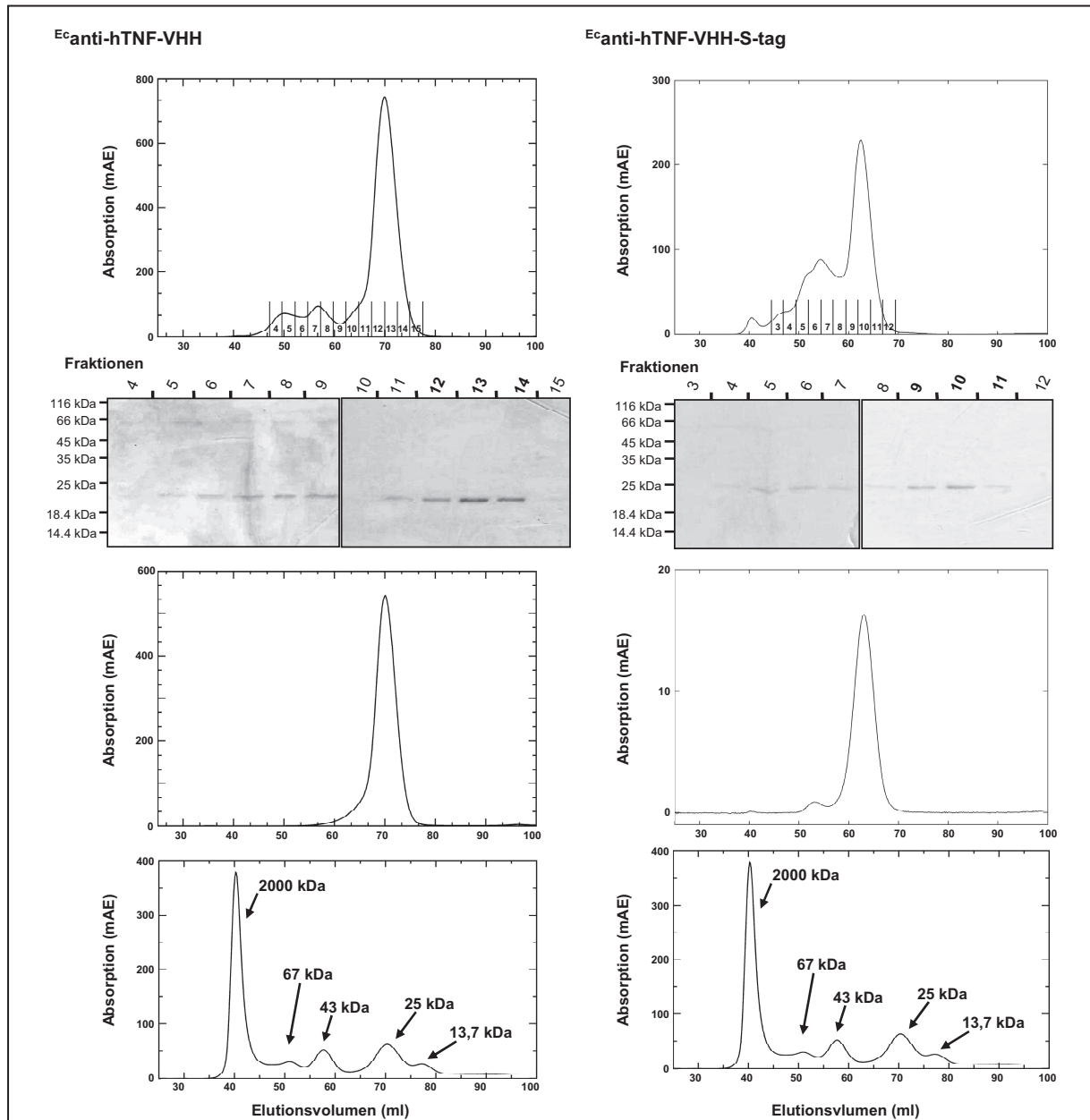


Abb. 5-3 Größenausschlusschromatographie von E_c anti-hTNF-VHH und E_c anti-hTNF-VHH-S-tag.

Die mittels Ni-NTA gereinigten Proteine wurden zunächst in den Laufpuffer (500 mM NaCl 50 mM Natriumphosphatpuffer pH = 7,4) umgepuffert und dann per Größenausschlusschromatographie getrennt. Ein Teil des Proteins verlässt die Säule als di- oder multimeren Komplexe. Entsprechende Fraktionen auf Coomassie-gefärbten SDS-PAGE Gelen zeigen, dass diese höhermolekulare Komplexe auf nicht-kovalenten Bindungen beruhen. Bei erneuter Größenausschlusschromatographie der monomeren Fraktionen zeigt sich, dass diese stabil Monomere bleiben. Die anhand der Kalibrierung der Säule errechnete Größe beträgt für E_c anti-hTNF-VHH 22,1 kDa (erwartet 17,3 kDa) und für E_c anti-hTNF-VHH-S-tag 34,1 kDa (erwartet 20,9 kDa).

Größenausschlusschromatographie weiter gereinigt. Um die Proteinverluste auf der Säule zu

reduzieren, wurde anfangs ein Puffer höherer Molarität (500 mM NaCl in Phosphatpuffer) als Laufpuffer verwendet. Die Proteine wurden in den Laufpuffer umpuffert, um eventuelle Probleme durch hohe Osmolarität (500 mM Imidazol in 500 mM NaCl in Phosphatpuffer) zu vermeiden (Bedingungen bei Abb. 5-3).

Auf den in Abb. 5-3 dargestellten UV-Absorptionskurven der Größenausschlusschromatographie zeigt sich, dass der Großteil des Ec anti-hTNF-VHH und des Ec anti-hTNF-VHH-S-tag als Monomere die Säule verlässt. Allerdings finden sich auch dimere und höhermolekulare Anteile. Entsprechende Fraktionen aufgetragen auf ein SDS-PAGE Gel zeigen, dass diese nicht-kovalente Komplexe darstellen.

Bei erneuter Größenausschlusschromatographie nur der monomeren Fraktionen (für Ec anti-hTNF-VHH 12-14 und für Ec anti-hTNF-VHH 9-11) zeigt sich, dass diese stabil sind und einen klaren einzelnen Peak ohne größere multimere Anteile bilden (Abb. 5-3). Für Ec anti-hTNF-VHH läuft dieser bei 70,3 ml Elutionsvolumen und damit auf einer Höhe von 22,1 kDa (erwartetes Molekulargewicht (MW): 17,3 kDa). Für Ec anti-hTNF-VHH-S-tag liegt der Peak bei 62,3 ml Elutionsvolumen und damit bei 34,8 kDa (erwartetes MW 20,9 kDa) liegt.

Bei der Herstellung größerer Mengen an Ec anti-hTNF-VHH-S-tag wurde nach der Ni-NTA Agarose Affinitätschromatographie das rekombinante Protein direkt im Elutionspuffer auf die Säule mit 10 mM Natriumphosphatpuffer (dem späteren Dimerisierungspuffer) als Laufpuffer

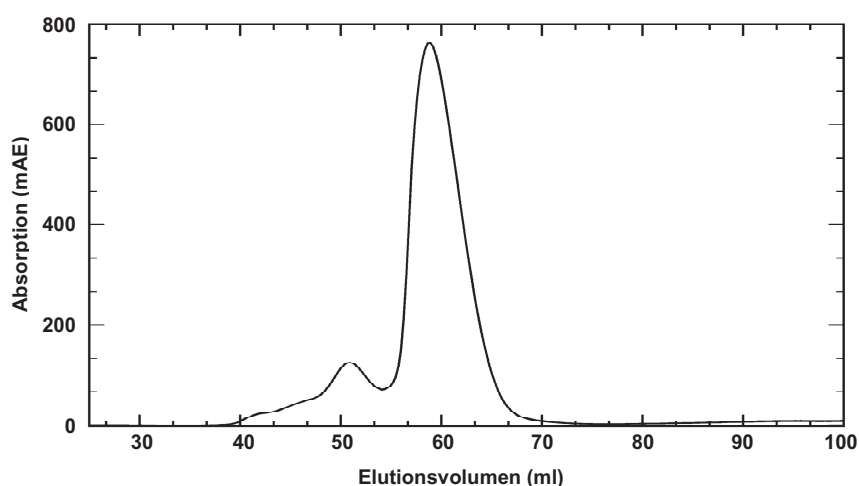
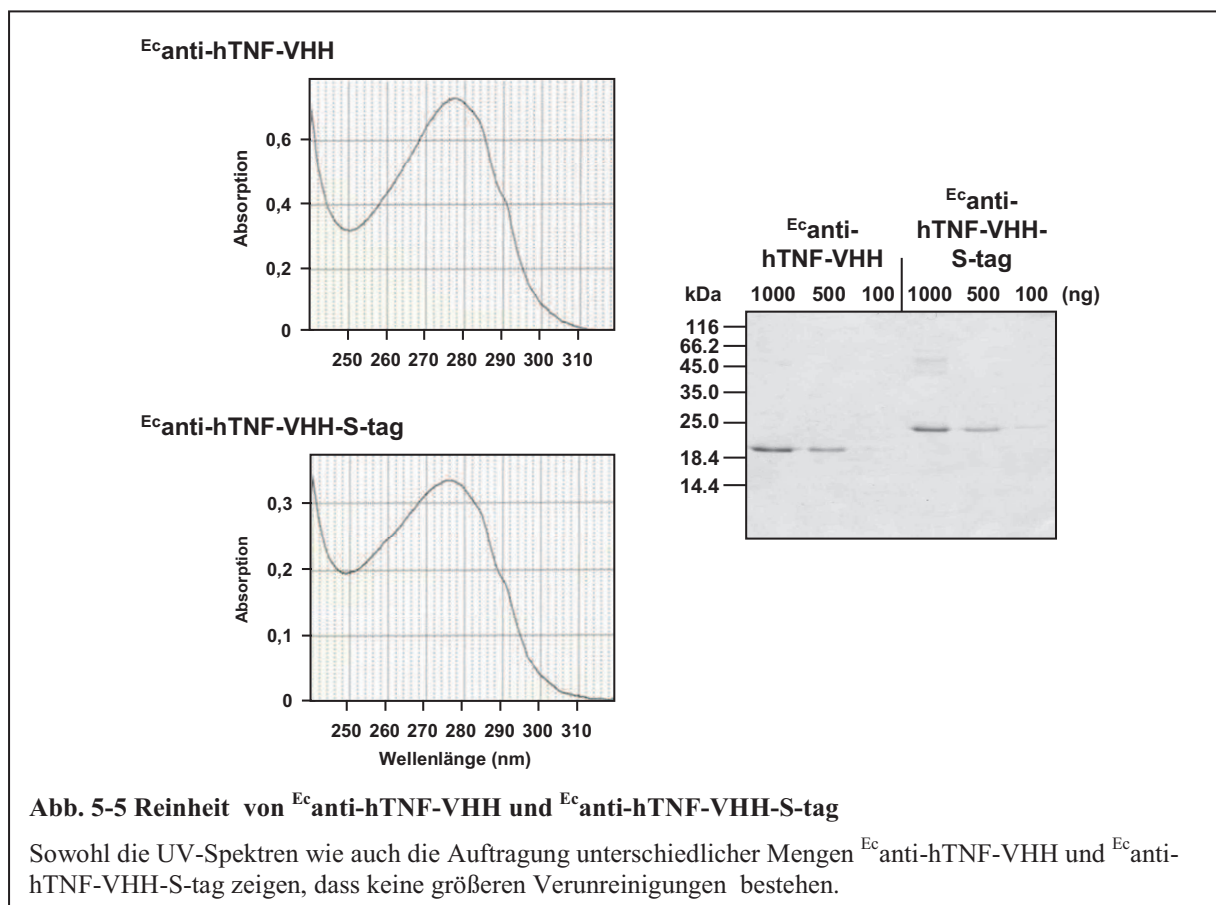


Abb. 5-4 Größenausschlusschromatographie von Ec anti-hTNF-VHH-S-tag in größerem Maßstab

Das nicht umpufferte Protein wurde noch im Ni-NTA Affinitätschromatographie Elutionspuffer (500 mM Imidazol in 500 mM NaCl Natriumphosphatpuffer) ohne Umpufferung direkt nach Größe getrennt. Als Laufpuffer wurde der MTG-Reaktionspuffer (10 mM Natriumphosphat pH = 7,5) verwendet. Dabei verhält es sich auf der Größenausschlusschromatographiesäule trotz großer Osmolaritätsdifferenzen (von über 1M zu 10 mM) mit einem Hauptpeak bei 58,9 ml ähnlich wie vorher umpuffertes Protein in 500 mM NaCl 50 mM Natriumphosphatpuffer pH = 7,4 Laufpuffer (Hauptpeak bei 62,3 ml). (Vergleiche Abb. 5-3).

appliziert. Das Ec anti-hTNF-VHH-S-tag verhält sich unter diesen Bedingungen trotz größerer Osmolaritätsdifferenzen (von über 1 M auf 10 mM) mit einem Hauptpeak bei 58,9 ml ähnlich wie das zuvor umgepufferte Protein in einem 500 mM NaCl Natriumphosphatpuffer (Hauptpeak bei 62,3 ml) (Abb. 5-4).

Nach Reinigung mittels Ni-NTA Affinitätschromatographie und Größenausschlusschromatographie sind sowohl Ec anti-hTNF-VHH als auch Ec anti-hTNF-VHH-S-tag ohne größere Verunreinigungen vorhanden (Abb. 5-5).



An reinem rekombinanten Protein (Ec anti-hTNF-VHH und Ec anti-hTNF-VHH-S-tag) konnten ungefähr 10 mg pro Liter Bakterienüberstand gewonnen werden.

5.1.1.4 Verifizierung des Molekulargewichtes von Ec anti-hTNF-VHH mittels MALDI-TOF (*matrix assisted laser desorption/ionisation – time of flight*) Massenspektrometrie

Zur Bestimmung der genauen Masse von Ec anti-hTNF-VHH und Ec anti-hTNF-VHH-S-tag wurde mit beiden Proteinen eine MALDI-TOF Massenspektrometrie durchgeführt. Bei Ec anti-hTNF-VHH ergab der Hauptpeak eine Masse von 17272,2 Da (Abb. 5-6). Die

isotopengemittelte Berechnung für das Molekulargewicht von Ec anti-hTNF-VHH ergibt 17278,9 Da. Die errechnete monoisotopische Masse beträgt 17268,3 Da (Bioinformatics 2011). Damit liegt das gemessene Molekulargewicht zwischen dem isotopengemittelten und monoisotopischen Gewicht. Der Unterschied zum Isotopen gemittelten Molekulargewicht beträgt 6,5 Da und liegt bei 0,038% der erwarteten Masse.

Für Ec anti-hTNF-VHH-S-tag waren aus der MALDI-TOF Massenspektrometrie trotz dreifacher Durchführung keine verwertbaren Daten zu gewinnen. Eine mögliche Erklärung wäre die Bildung von hochmolekularen Komplexen unter den Bedingungen der MALDI-TOF, welche dann außerhalb des Messbereiches lägen.

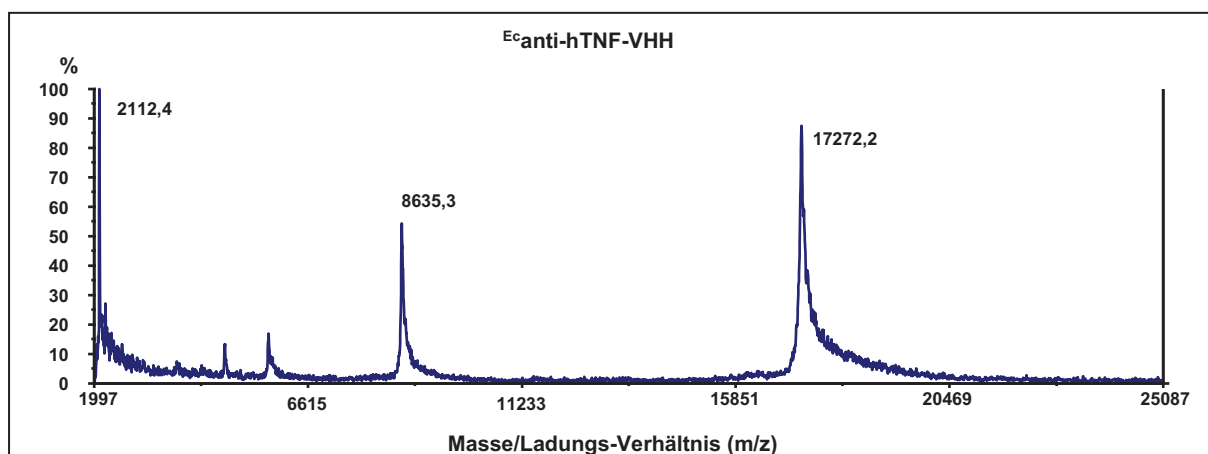


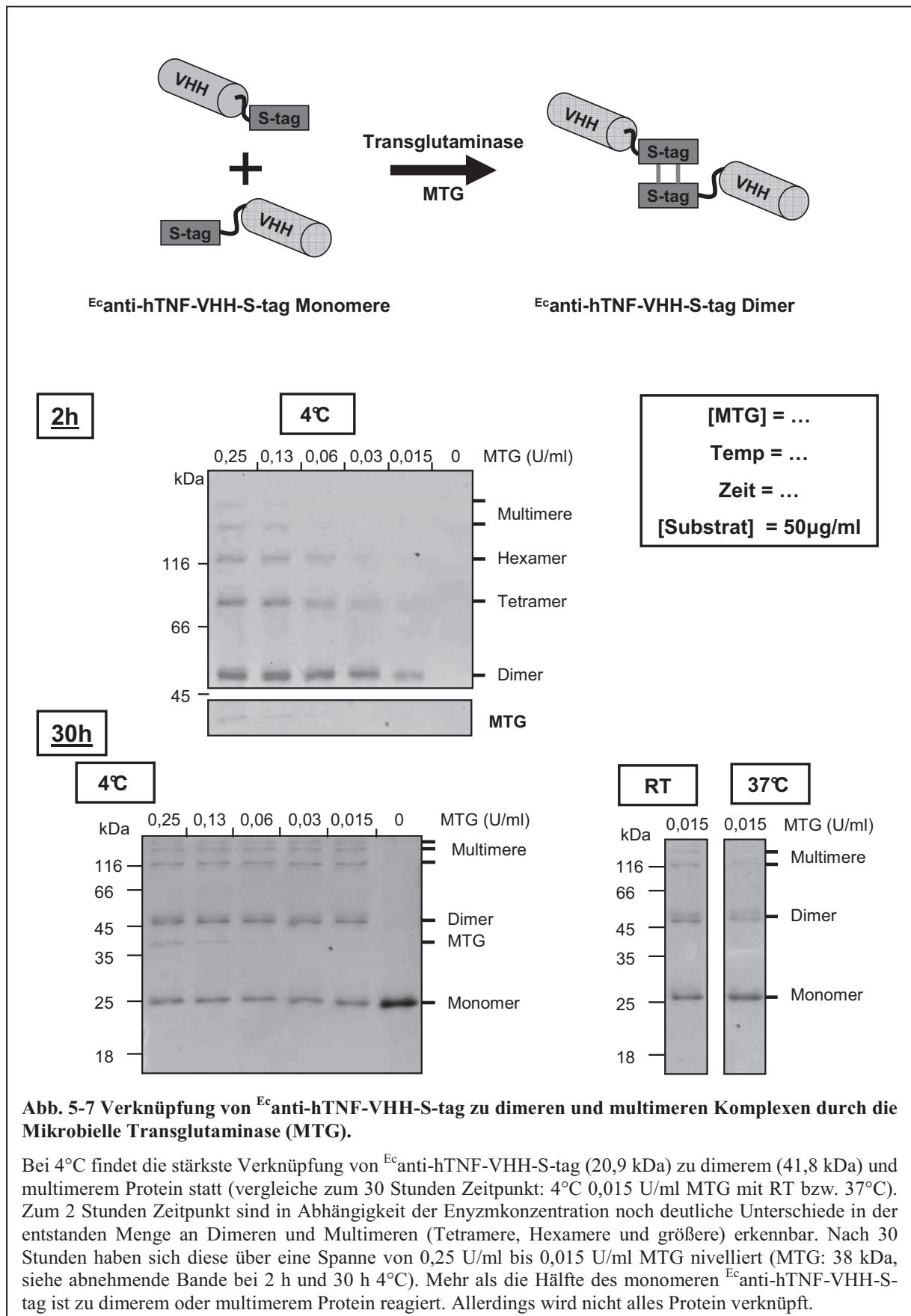
Abb. 5-6 Massenspektrometrie von Ec anti-hTNF-VHH mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie

Die ermittelte Masse für Ec anti-hTNF-VHH beträgt 17272,2 Da. Diese liegt zwischen dem errechneten für isotopengemittelten Molekulargewicht von 17278,8 Da und dem monoisotopischen von 17268,2 Da. Der Unterschied zum Isotopen gemittelten Molekulargewicht beträgt 6,6 Da und damit 0,038 %. Für Ec anti-hTNF-VHH-S-tag waren mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie keine verwertbaren Daten zu ermitteln.

5.1.1.5 Herstellung dimerer Ec anti-hTNF-VHH-S-tag Nanobodies durch die Mikrobielle Transglutaminase (MTG)

5.1.1.5.1 Optimierung der Dimerisierung von Ec anti-hTNF-VHH-S-tag durch MTG

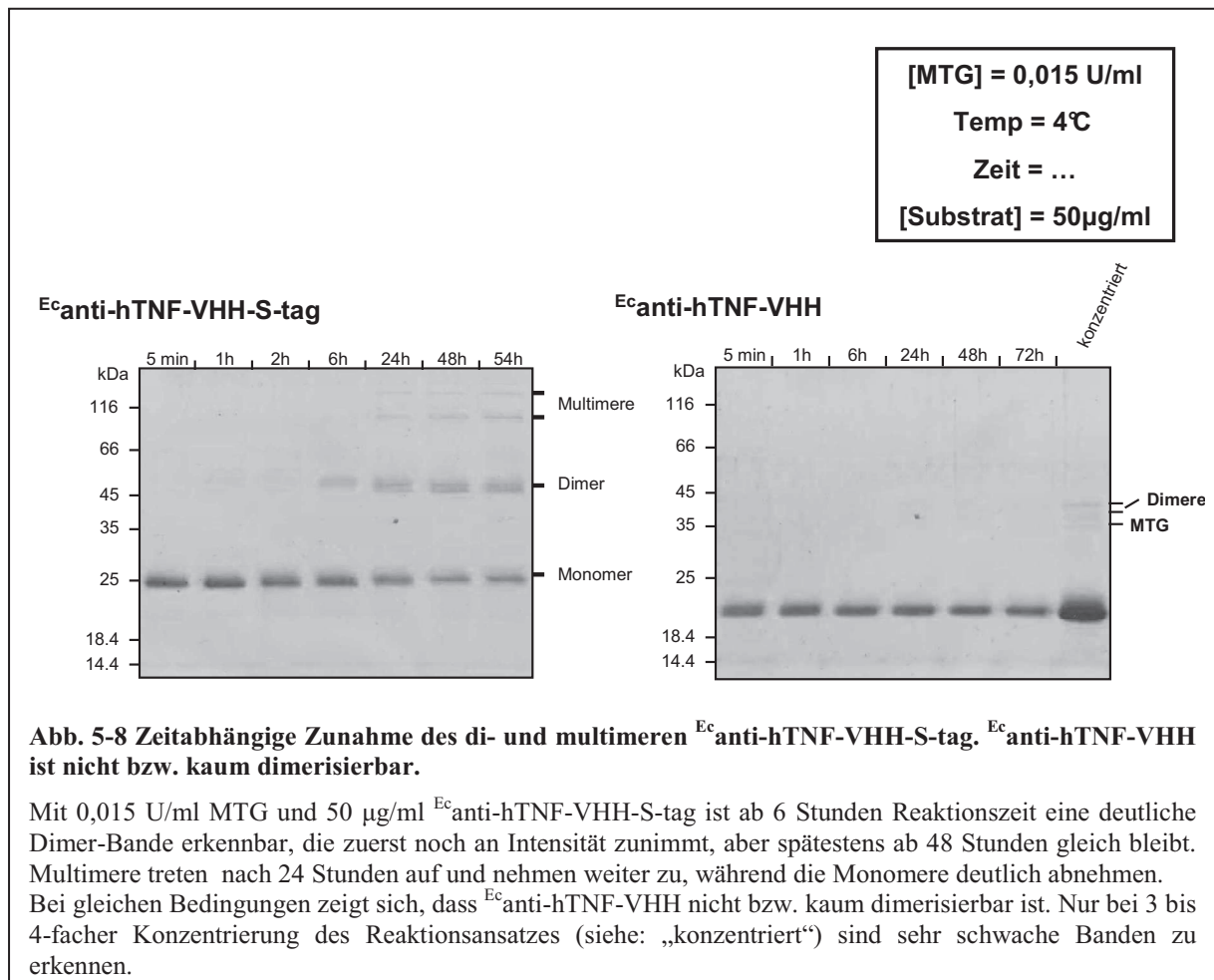
Zur Verknüpfung von monomerem Ec anti-hTNF-VHH-S-tag zu Dimeren wurde die Mikrobielle Transglutaminase (MTG) (N-Zyme-BioTec-GmbH 2007) verwendet. Im Vergleich verschiedener Reaktionen bei unterschiedlichen Temperaturen zeigte die MTG bei 4°C die höchste Aktivität. Bei 0,015 U/ml MTG und 50 µg/ml Ec anti-hTNF-VHH-S-tag werden bei 4°C mehr dimeres und multimeres Ec anti-hTNF-VHH-S-tag gebildet als bei Raumtemperatur (RT) oder 37°C (Abb. 5-7: 30h-Zeitpunkt).



Nach 2 Stunden Reaktionszeit existieren in Abhängigkeit von der MTG-Konzentration deutliche Unterschiede in der Menge des entstandenen dimeren und multimeren ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag Proteins (vergleiche Abb. 5-7 2h-Zeitpunkt: z.B. 0,25 U/ml vs. 0,015 U/ml MTG). Nach 30 Stunden Reaktionszeit haben sich diese nivelliert. Über eine Spanne von 0,25 U/ml bis 0,015 U/ml MTG scheint bei 50 µg/ml ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag die Reaktion fertig abgelaufen zu sein. Mehr als die Hälfte des ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag Proteins ist in Dimere oder Multimere umgewandelt worden. Allerdings reagiert trotz mehr als genügend Reaktionszeit nicht alles ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag zu Di- oder Multimeren.

Neben dimerem ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag (41,8 kDa) entstehen nur tetrameres (83,6 kDa) und hexameres (125,4 kDa), aber kein trimeres (62,7 kDa) oder pentameres Protein (104,5 kDa).

In Abb. 5-8 ist eine Zeitreihe mit 0,015 U/ml MTG bei 4°C und 50 µg/ml ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag bzw. ^{Ec}anti-hTNF-VHH zu sehen. Mit zunehmender Reaktionszeit entsteht mehr dimeres und multimeres ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag. Ab dem 6 Stunden Zeitpunkt ist eine deutliche Dimerbande vorhanden, die zunächst noch etwas zunimmt, aber spätestens nach 48



Stunden gleichbleibt. Größere Mengen Multimere treten erst ab 24 Stunden auf und nehmen mit der Zeit weiter zu. Gegenläufig nimmt die Intensität der Monomerbande ab. Nebenbefundlich fällt auf, dass die Dimerbande aus mehreren Unterbanden besteht (siehe auch Abb. 5-9).

^{Ec}anti-hTNF-VHH hingegen ist sowohl unter diesen als auch unter anderen Bedingungen (Daten nicht gezeigt) nicht, beziehungsweise nahezu gar nicht dimerisierbar. Eine minimale Verknüpfung von Proteinen erkennt man in den drei sehr schwachen Banden in der Spalte „konzentriert“. Hier wurde das Reaktionsgemisch am Ende der Reaktion ca. um Faktor 3-4 aufkonzentriert bevor es auf das Gel aufgetragen wurde. Die unterste der hier sichtbaren Banden stellt die MTG dar, die beiden Banden darüber sind zu Dimeren verknüpfte ^{Ec}anti-hTNF-VHH.

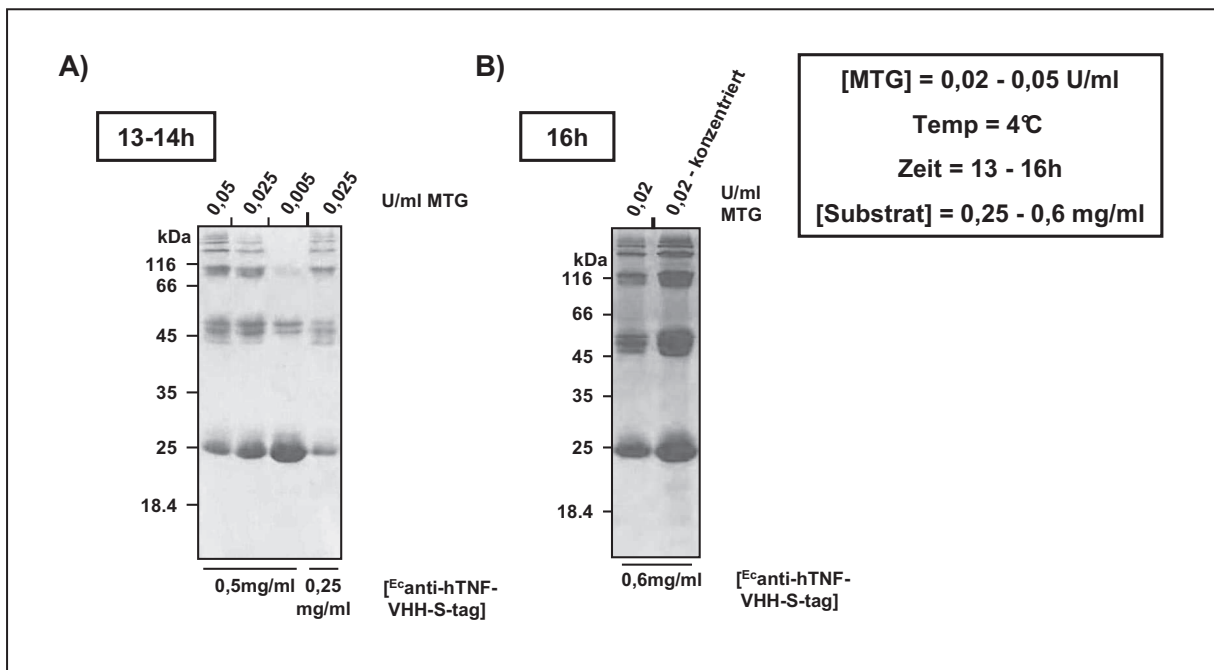


Abb. 5-9 Höhere ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag Konzentrationen stellen auch bei kürzeren Reaktionszeiten kein Problem dar.

A) Zur Vereinfachung der Dimer-Produktion wurden höhere Konzentrationen an ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag mit unterschiedlichen Konzentrationen MTG 13-14 Stunden bei 4°C inkubiert. Mit zunehmender MTG Konzentration entstehen bei 500 µg/ml ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag mehr Dimere und Multimere. Die Menge an Dimeren unterscheidet sich dabei zwischen 0,025 U/ml und 0,05 U/ml MTG nicht. Bei niedrigerer ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag Konzentration (250 µg/ml) ist die Konzentration an Dimeren geringer. Aufgrund dieser Tatsachen wurde für die Produktion größerer Mengen dimeren Proteins eine ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag Konzentration von ungefähr 500 µg/ml gewählt und mit 0,01-0,02 U/ml MTG ca. 15 Stunden bei 4°C inkubiert. **B)** Beispielhafte Darstellung des Ergebnisses einer der Reaktionsansätze im größeren Maßstab ([^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag]=0,6 mg/ml mit 0,02 U/ml MTG für 16 Stunden).

Zur Vereinfachung der Dimerproduktion wurden höhere Konzentrationen ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag mit unterschiedlichen Konzentrationen MTG für 13-14 Stunden bei 4°C inkubiert (Abb.

5-9 A). Mit zunehmender Enzymmenge (von 0,005 zu 0,05 U/ml MTG) werden bei 500 µg/ml ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag mehr dimere und multimerer Proteine gebildet. Die entstandene Menge an Dimeren unterscheidet sich dabei zwischen 0,025 U/ml und 0,05 U/ml MTG nicht.

Bei halbiertes ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag Konzentration (0,25 mg/ml) ist die Konzentration an Dimeren geringer, wobei sich die Verhältnisse von Monomer zu Dimeren und Multimeren nicht stark verändern (vergleiche Abb. 5-9 bei 0,025 U/ml MTG: 0,5 mg/ml vs. 0,25 mg/ml ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag).

Aus den Optimierungsversuchen ergab sich für die Produktion größerer Mengen dimeren ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tags folgendes Protokoll: ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag Konzentrationen von ungefähr 500 µg/ml, MTG Konzentrationen von 0,01-0,02 U/ml und Reaktionszeiten um 15 Stunden. Beispielhaft ist in Abb. 5-9 B) das Ergebnis einer der Reaktionen gezeigt (0,6 mg/ml ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag, 0,02 U/ml MTG und 16 Stunden Reaktionszeit bei 4°C). Die Spalte „0,02 U/ml MTG – konzentriert“ in Abb. 5-9 B) zeigt den um Faktor 2-3 aufkonzentrierten Reaktionsansatz für die Applikation auf die Größenausschlusschromatographie.

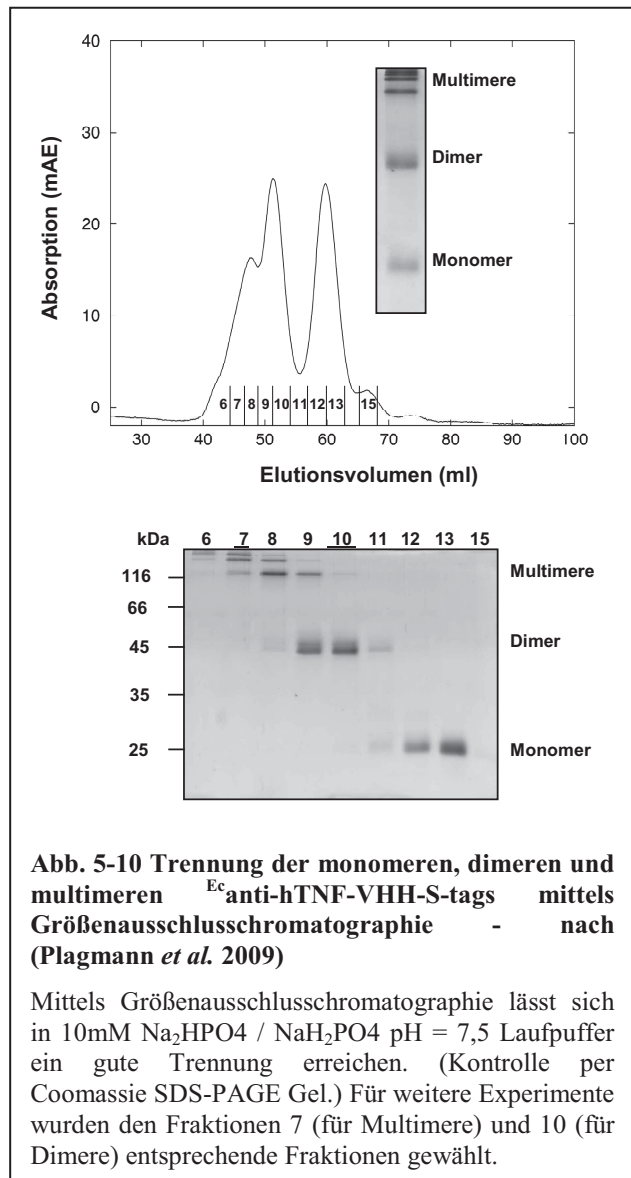
5.1.1.5.2 Trennung der mono-, di-, und multimeren ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag Proteine mittels Größenausschlusschromatographie

Mittels Größenausschlusschromatographie ist in 10 mM Natriumphosphatlaufpuffer eine gute Trennung der Multimere und Dimere von den Monomeren zu erzielen (Abb. 5-10).

Die UV-Absorptionskurve zeigt ebenfalls, dass deutlich mehr als 50% des monomeren ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tags zu di- oder multimerem Protein verknüpft wurden.

Der Dimerpeak läuft bei einem Elutionsvolumen von 50 ml, was einer Größe von ca. 65-70 kDa entspräche. Dies ist in etwa das Doppelte des mittels Größenausschlusschromatographie ermittelten Wertes für das ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag Monomer (34,8 kDa – erwartetes MW 20,9 kDa).

Für die weiteren Experimente wurden Fraktionen verwendet, die den beispielhaft markierten entsprechen (Fraktion 7 für Multimere und Fraktion 10 für Dimere).



5.1.2 Untersuchung der Proteineigenschaften von E_c anti-hTNF-VHH, monomeren und dimerem E_c anti-hTNF-VHH-S-tag

5.1.2.1 hTNF Bindungs- und Neutralisierungsverhalten von E_c anti-hTNF-VHH und E_c anti-hTNF-VHH-S-tag

5.1.2.1.1 E_c anti-hTNF-VHH und E_c anti-hTNF-VHH-S-tag binden hTNF im ELISA

Sowohl E_c anti-hTNF-VHH als auch E_c anti-hTNF-VHH-S-tag binden hTNF im ELISA (Abb. 5-11). Beide werden in vergleichbarer Menge durch die Detektionsantikörper nachgewiesen. Als Negativkontrolle wurden nicht mit hTNF beschichtete Felder verwendet.

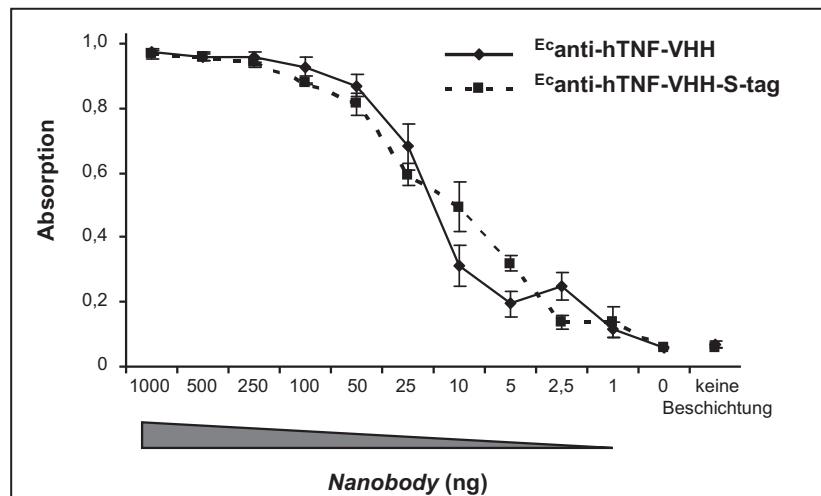


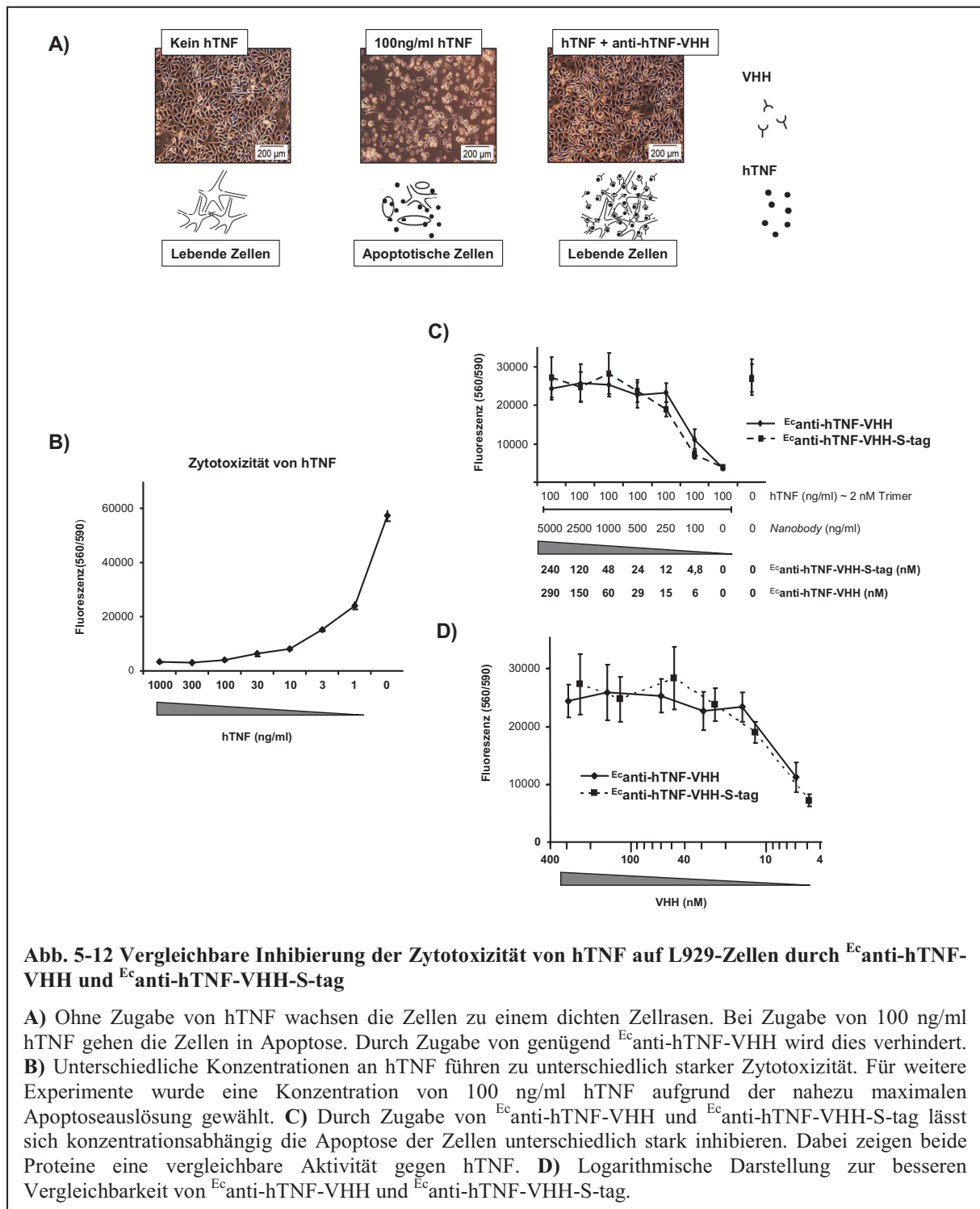
Abb. 5-11 E_c anti-hTNF-VHH und E_c anti-hTNF-VHH-S-tag erkennen und binden beide hTNF im ELISA

Sowohl E_c anti-hTNF-VHH als auch E_c anti-hTNF-VHH-S-tag erkennen und binden an das auf der ELISA-Platte aufgetragene hTNF. Beide Proteine werden in gleichem Maße nach Bindung an hTNF durch gegen das „c-myc tag“ gerichtete AK nachgewiesen. Als Negativkontrolle wurden nicht mit hTNF beschichtete Felder verwendet.

5.1.2.1.2 E_c anti-hTNF-VHH und E_c anti-hTNF-VHH-S-tag besitzen eine vergleichbare hTNF neutralisierende Aktivität im L929-Zytotoxizitätsassay

Adhärente L929 Zellen wurden in Zellkulturmedium mit unterschiedlichen Konzentrationen an hTNF für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Ohne hTNF wachsen L929-Zellen zu einem dichten Rasen von verzweigten Zellen heran (Abb. 5-12 A). Bei Zugabe von 100 ng/ml hTNF gehen die Zellen in Apoptose. Sie runden sich ab und beginnen sich von dem Untergrund zu lösen. Die Auslösung der Apoptose kann durch Zugabe von genügend E_c anti-hTNF-VHH Protein verhindert werden.

In Abb. 5-12 B) ist der Effekt von unterschiedlichen Konzentrationen hTNF auf die Zellen dargestellt. Lebende Zellen wurden anhand der Produktion eines fluoreszierenden Farbstoffes nachgewiesen, sodass bei höheren hTNF Konzentrationen aufgrund verstärkter Apoptose die



Fluoreszenz abnimmt. Aufgrund der nahezu maximalen Apoptoseauslösung bei einer Konzentration von 100 ng/ml hTNF wurde diese Konzentration für weitere Experimente gewählt. Sowohl ^{Ec}anti-hTNF-VHH als auch ^{Ec}anti-hTNH-VHH-S-tag verhindern konzentrationsabhängig die Apoptose der L929-Zellen. Mit einem halbmaximalen Effekt bei einer Konzentration von 8,3 nM (0,83 pmol pro well) für ^{Ec}anti-hTNF-VHH und 9,3 nM

(0,93 pmol pro well) für ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag zeigen sie eine vergleichbare Aktivität gegen hTNF. 100 ng/ml hTNF entsprechen 5,8 nM Monomeren und 1,9 nM Trimeren (0,58 pmol Monomere pro well und 0,19 pmol Trimere pro well). Das entspricht beim halbmaximalen Effekt ungefähr einem stöchiometrischen Verhältnis von 4 bis 5 Molekülen ^{Ec}anti-hTNF-VHH(-S-tag) zu einem trimeren hTNF Komplex.

5.1.2.1.3 In der Größenausschlusschromatographie bindet ein ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag an trimeres hTNF

Zur Untersuchung der Interaktion von hTNF und ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag in der Größenausschlusschromatographie wurde 10 mM Natriumphosphatpuffer bei pH = 7,5 mit 150 mM NaCl als Laufpuffer benutzt. Die Ergänzung des Laufpuffers um 150 mM NaCl war notwendig, da sonst hTNF unspezifisch an das Säulenmaterial gebunden hat.

hTNF und ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag wurden zunächst getrennt auf die Säule gegeben (Abb. 5-13). Für ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag (175 µg verwendet) ergab sich eine berechnete Größe von 34,2 kDa (erwartetes MW: 20,9 kDa, Elutionsvolumen: 63,1 ml) (zum Vergleich bei 500 mM NaCl 50 mM Natriumphosphatpuffer pH = 7,4: 34,8 kDa). Die berechnete Größe für hTNF (200 µg verwendet) betrug 40,6 kDa (Elutionsvolumen: 59,7 ml), was bei einer Größe des monomeren Moleküls von 17,3 kDa für einen dimeren (34,6 kDa) oder trimeren (51,9 kDa) Komplex spricht.

Im nächsten Schritt wurden 525 µg hTNF zusammen mit 175 µg ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag auf die Säule gegeben. Das entspricht einem molekularen Verhältnis von hTNF zu ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag von ungefähr 3:1 (genau 3,7:1). Nach Vorinkubation bei 4°C wurde das Gemisch nach Größe getrennt. Es zeigte sich eine nahezu komplette Verschiebung des hTNF Gipfels zu einem neuen Gipfel bei ungefähr 80 kDa (83,2 kDa, Elutionsvolumen: 45,5 ml). Ein Komplex aus einem Trimer hTNF und einem Molekül ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag hätte eine Größe von 72,8 kDa (3x 17,3 kDa + 1x 20,9 kDa), was ungefähr in derselben Größenordnung liegt.

Proben aus den Hauptfraktionen der in Abb. 5-13 A) nummerierten Gipfel wurden in gleichen Mengen auf ein SDS-Page Gel aufgetragen (Abb. 5-13 B 1: ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag, 2: hTNF, 3: Komplex aus hTNF und ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag und 4: restliches freies hTNF). Aufgrund der unterschiedlichen Anfärbbarkeit von ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag und hTNF für Coomassie-Farblösung ist in Spalte 3 die Intensität der beiden Banden ähnlich. (Im Vergleich von Spalte 1 und 2, die ungefähr gleiche Mengen Protein enthalten (175 µg ^{Ec}anti-hTNF-

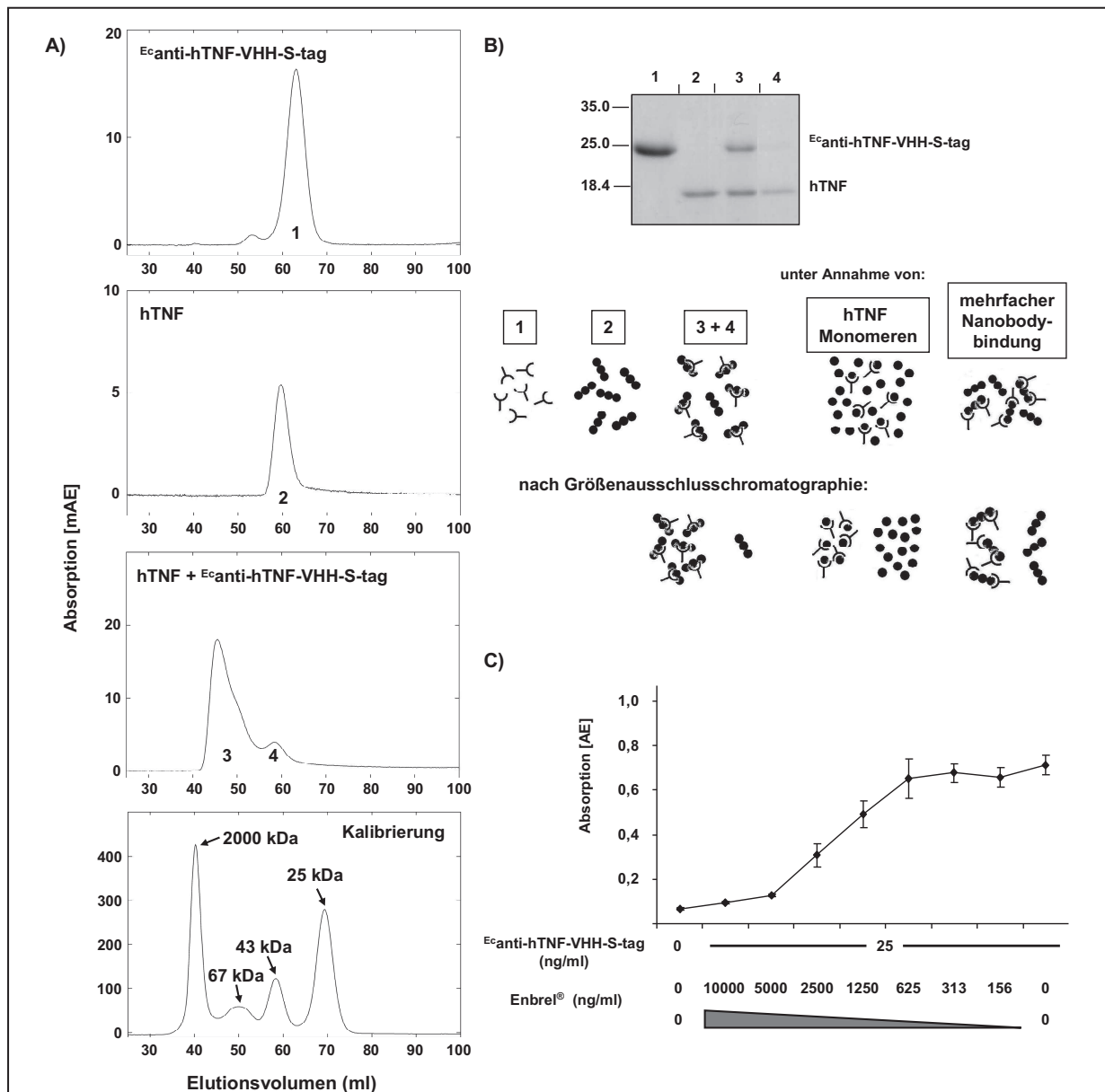


Abb. 5-13 *E_c* anti-hTNF-VHH-S-tag bindet trimeres hTNF und konkurriert mit Enbrel® um die Bindung - nach (Plagmann *et al.* 2009)

A) In 10 mM Natriumphosphatpuffer bei $\text{pH} = 7,5$ mit 150 mM NaCl als Laufpuffer wurden zunächst *E_c* anti-hTNF-VHH-S-tag und hTNF getrennt mittels Größenausschlusschromatographie analysiert. Für *E_c* anti-hTNF-VHH-S-tag (MW = 20,9 kDa) ergab sich eine geschätzte Größe von 34,2 kDa. Die geschätzte Größe für hTNF (MW = 17 kDa) betrug 40,6 kDa, was für einen dimeren (34,6 kDa) oder trimeren (51,9 kDa) Komplex spricht. Bei Trennung eines 1 : 3,7 *E_c* anti-hTNF-VHH-S-tag zu hTNF (Monomer) Gemischs ist nahezu der gesamte hTNF Gipfel verschwunden. Dies spricht dafür, dass je ein *E_c* anti-hTNF-VHH-S-tag Molekül an ein trimeres hTNF Molekül bindet ohne dies zu zerstören (Komplexgröße siehe Text). **B)** Coomassie gefärbtes SDS-PAGE Gel der nummerierten relevanten Fraktionen der Größenausschlusschromatographieläufe mit erläuternder Skizze **C)** Nach zunächst erfolgter Bindung von 25 ng/ml *E_c* anti-hTNF-VHH-S-tag an auf der ELISA-Platte gebundenes hTNF ist Enbrel® in der Lage dieses konzentrations-abhängig zu verdrängen. Ein halbmaximaler Effekt zeigt sich bei 1 Stunde Verdrängungszeit bei Enbrel® Konzentrationen zwischen 1,25 und 2,5 $\mu\text{g/ml}$.

VHH-S-tag und 200 μg hTNF auf Säule aufgetragen und gleiche Mengen aufs SDS-Page Gel

aufgebracht) wird die unterschiedliche Anfärbarkeit der beiden Proteine für Coomassie-Farblösung, die vor allem basische Aminosäuren färbt (Tal *et al.* 1985), deutlich.)

5.1.2.1.4 Enbrel[®] (Etanercept) konkurriert mit ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag um die hTNF Bindung

Auf einer mit hTNF beschichteten ELISA-Platte durfte zunächst ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag (25 ng/ml=1,2 nM) an hTNF binden. Anschließend wurde der ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag Überstand durch unterschiedliche Konzentrationen an Enbrel[®] ersetzt, welches gebundenes ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag verdrängte. Ein halbmaximaler Effekt wurde zwischen 2,5 und 1,25 µg/ml (16,7 nM und 8,3 nM) Enbrel[®] (MW ca. 150 kDa (Pfizer 2011)) erreicht (Abb. 5-13 C).

5.1.2.2 hTNF Bindungs- und Neutralisierungsverhalten von dimerem (und multimerem) ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag

5.1.2.2.1 Dimeres und multimeres ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag binden hTNF im ELISA

Im ELISA gegen immobilisiertes hTNF lassen sich mittels anti-c-myc Antikörper und folgender anti-Maus IgG Meerrettich Peroxidase sowohl dimeres als auch multimeres ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag nachweisen. Beide binden an hTNF. Allerdings zeigen sich die dargestellten deutlichen Unterschiede in der Nachweisreaktion bei monomerem im Vergleich zu

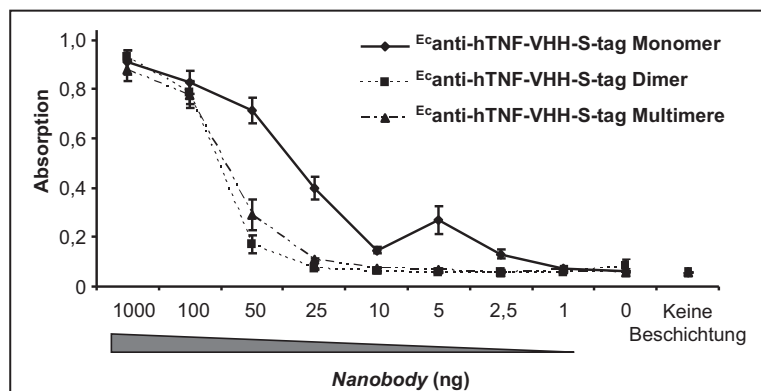


Abb. 5-14 Auch dimeres und multimeres ^{Ec}anti-TNF-VHH-S-tag erkennen und binden an hTNF

Dimeres und multimeres ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag erkennen und binden das auf der ELISA Platte befindliche hTNF. Allerdings finden sich in der Nachweisreaktion bei dimerem und multimerem ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag deutliche Unterschiede im Vergleich zu monomerem Protein. Als Negativkontrolle wurden nicht mit hTNF beschichtete Felder verwendet.

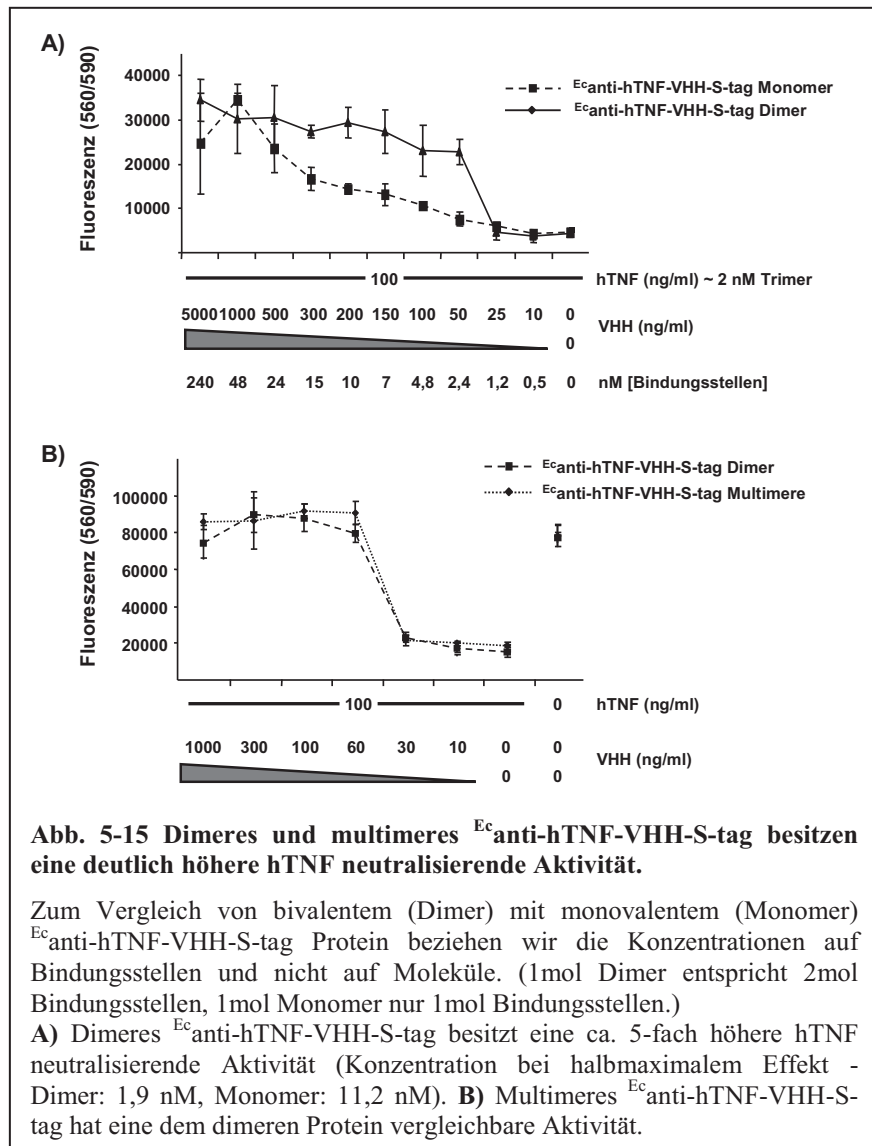
dimerem und multimerem ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag (Abb. 5-14). Für ein halbmaximales Signal benötigen dimeres und multimeres Protein eine etwa zweifach höhere Konzentration verglichen mit dem monoren *Nanobody*. Dies liegt möglicherweise an einer verringerten Nachweisbarkeit durch Veränderungen im Bereich des c-myc tags (genauerer siehe 6.2.2.3).

Als Negativkontrolle wurden nicht mit hTNF beschichtet Felder verwendet, mit denen ansonsten gleich verfahren wurde.

5.1.2.2.2 Dimeres und multimeres ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag besitzen eine deutlich höhere hTNF neutralisierende Aktivität im L929-Zytotoxizitätsassay

Zum Vergleich der hTNF neutralisierenden Eigenschaften der monomeren und dimeren Nanobodies wurde der zytotoxische Effekt von hTNF auf L929-Zellen durch Zugabe an unterschiedliche Konzentrationen von *Nanobody* gehemmt. Die Menge an lebenden Zellen wurde anhand der Produktion eines fluoreszierenden Farbstoffes quantifiziert. Das dimerisierte ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag benötigt im Vergleich zum monomeren Protein eine deutlich geringere Konzentration und besitzt somit eine höhere hTNF neutralisierende Aktivität (Abb. 5-15 A).

Bezogen auf die Konzentrationen an Bindungsstellen zeigen die bivalenten ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag



Dimere bei 1,9 nM (0,95 nM Dimeren) eine halbmaximale Hemmung der hTNF-Zytotoxizität. Dies entspricht einem Verhältnis von dimerem ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag zu trimerem hTNF von ungefähr 1:2 beziehungsweise 1:1 von Bindungsstellen zu trimerem hTNF (1,93 nM). Im direkten Vergleich erreichten die monovalenten ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag

Monomere die halbmaximale hTNF Inhibition bei 11,2 nM. (Beim Vergleich zu ^{Ec}anti-hTNF-VHH erzielte ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag den halbmaximalen Effekt bei 9,3 nM (siehe 5.1.2.1.2 - S. 53)). Damit besitzt das dimere ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag eine ca. 5-fach höhere hTNF neutralisierende Aktivität als das monomere Protein.

Auch die als Nebenprodukt entstandenen multivalenten ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag Multimere zeigen im direkten Vergleich eine vergleichbare hTNF neutralisierende Aktivität (Abb. 5-15 B).

Die Unterschiede, die sich in Abb. 5-15 A) zeigen, sind sowohl morphologisch an den Zellen deutlich erkennbar als auch auf Proteinebene nachweisbar (Abb. 5-16). Die Morphologie der L929-Zellen ändert sich durch Auslösung der Apoptose von verzweigten Zellen mit Ausläufern (Abb. 5-16: Negativkontrolle) hin zu abgerundeten sich teilweise schon ablösenden Zellen (Abb. 5-16: Positivkontrolle). Bei einer Konzentration von 1 µg/ml schützen sowohl das monomere als auch das dimere ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag die Zellen vor Apoptose. Während dies auch bei 100 ng/ml dimerem ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag der Fall ist,

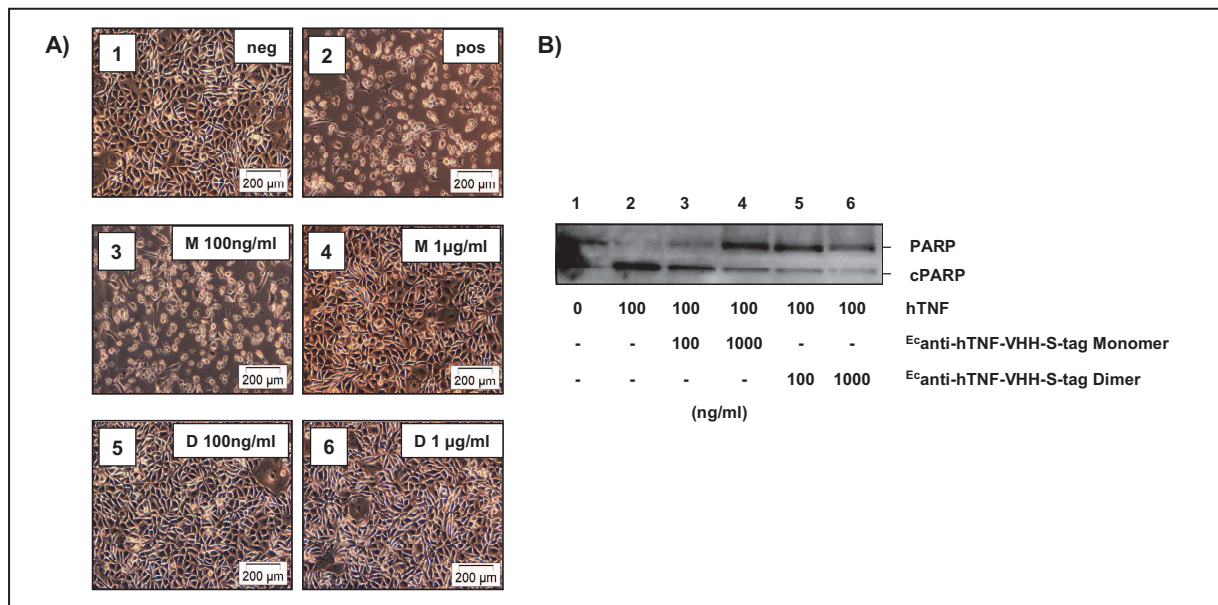


Abb. 5-16 Nachweis der höheren hTNF neutralisierenden Aktivität des dimeren ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tags auf Proteinebene.

A) Zwischen der Negativkontrolle („neg“) ohne hTNF (1) und der Positivkontrolle („pos“) mit 100 ng/ml hTNF (2) sind deutliche morphologische Unterschiede sichtbar. Durch die hTNF induzierte Apoptoseauslösung runden sich die ursprünglich verzweigten L929-Zellen ab. Während 100 ng/ml Dimer („D“) bereits in der Lage ist dies zu unterbinden (5), schafft das monomere ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag („M“) dies erst ab 1 µg/ml (4+6). **B)** Auf Proteinebene zeigt sich die Apoptoseauslösung durch die proteolytische Degradation der poly ADP-ribose polymerase (PARP) zu c-PARP (cleaved PARP). Hier zeigt sich dasselbe schon anhand der Morphologie zu erkennende Bild. Nur das dimere ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag Protein ist schon bei 100 ng/ml in der Lage die 100 ng/ml hTNF zu neutralisieren (3 vs. 5).

reichen 100 ng/ml monomeres E_c anti-hTNF-VHH-S-tag nicht aus, um die Apoptoseauslösung zu verhindern.

Dasselbe Bild ergibt sich auf der Proteinebene. Hier stellt sich die Apoptoseauslösung durch proteolytische Degradation der poly ADP-ribose polymerase (PARP) dar, wobei c-PARP entsteht. Auch hier verhindern 1 μ g/ml monomeres und dimeres E_c anti-hTNF-VHH-S-tag Protein die Apoptose, während ausschließlich dimeres E_c anti-hTNF-VHH-S-tag dies bereits bei 100 ng/ml tut (Abb. 5-16).

5.1.2.2.3 Dimeres E_c anti-hTNF-VHH-S-tag besitzt eine deutlich höhere hTNF neutralisierende Aktivität im HEK293-Zellen Stimulationsassay

In Kooperation mit der AG von Prof. Dr. med. Philip Rosenstiel (Institut für Klinische Molekularbiologie, UKSH Kiel) wurde ein hTNF HEK293-Zellen Stimulationsassay durchgeführt.

Die NF- κ B Aktivierung in HEK293-Zellen durch hTNF wurde über die Lumineszenz einer in ihrer Expression von NF- κ B abhängigen Luziferase quantifiziert. Die NF- κ B Aktivierung wurde durch Zugabe von verschiedenen Konzentrationen monomeren und dimeren E_c anti-hTNF-VHH-S-tags gehemmt. Auch hier zeigt sich die Überlegenheit des dimeren E_c anti-hTNF-VHH-S-tags (Abb. 5-17).

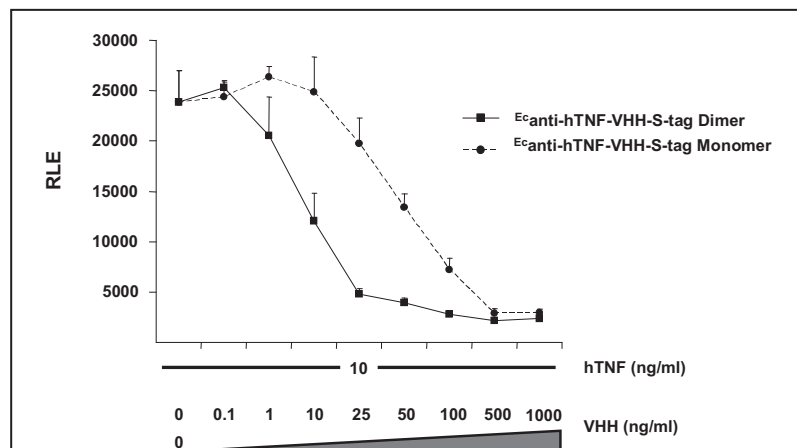
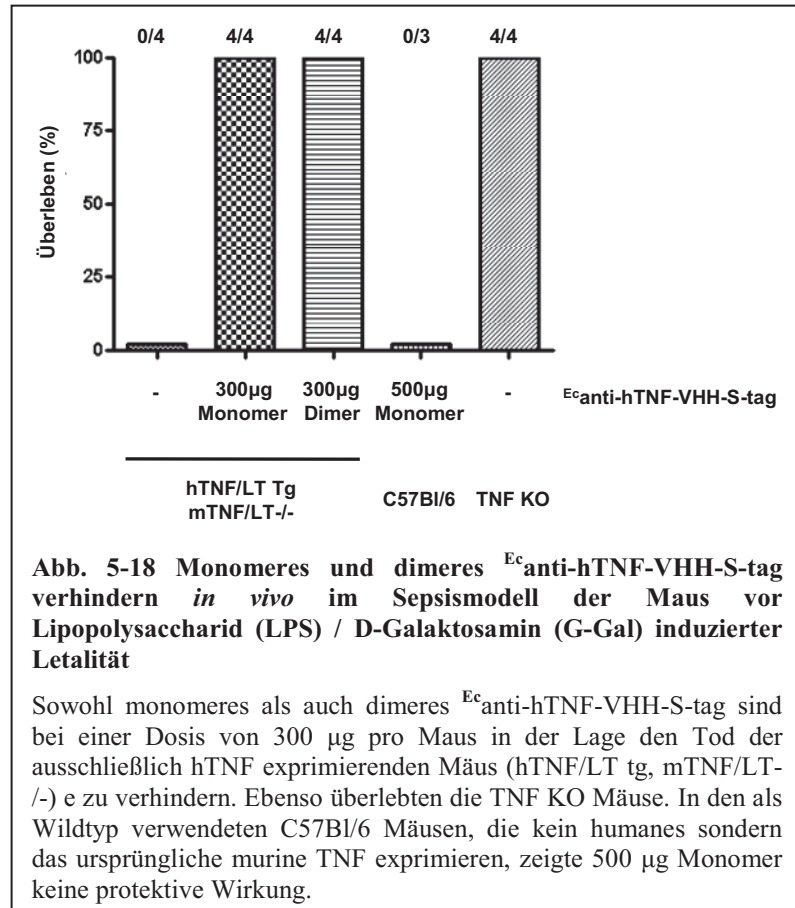


Abb. 5-17 Überlegenheit des dimeren E_c anti-hTNF-VHH-S-tag bei Inhibierung der hTNF abhängigen NF- κ B Aktivierung in HEK293-Zellen.

Bei der Stimulation von HEK293 Zellen mit hTNF wird der NF- κ B Signaltransduktionsweg aktiviert, welcher anhand der Lumineszenz einer in ihrer Expression von NF- κ B abhängigen Luziferase quantifiziert wurde. Durch Zugabe von mono- oder dimerem E_c anti-hTNF-VHH-S-tag wurde die NF- κ B Aktivierung gehemmt. Auch hier zeigt das dimere Protein eine höhere Aktivität als das Monomer.

5.1.2.3 Monomeres und dimeres ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag besitzen hTNF neutralisierende Aktivität *in vivo* und verhindern den Tod im Lipopolysaccharid (LPS) / D-Galaktosamin (D-Gal) Sepsismodell der Maus

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Entzündungsbiologie von Prof. Dr. Sergei Nedospasov am Deutschen Rheuma-Forschungszentrum Berlin wurde LPS / D-Galaktosamin Toxizität als Tiermodell der Sepsis in Mäusen verwendet. Um ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag als humanes TNF blockierendes Agens verwenden zu können, wurden für humanes TNF transgene Mäuse verwendet, die ausschließlich humanes und kein murines TNF exprimieren (hTNF/LT tg, mTNF/LT/-).



30 min nach intraperitonealer Gabe von LPS und D-Galaktosamin wurden monomeres oder dimeres ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag ebenfalls intraperitoneal appliziert. Für 24 Stunden waren sowohl monomeres als auch dimeres ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag bei einer Dosis von 300 µg pro Maus in der Lage den Tod der Mäuse zu verhindern (Abb. 5-18). Ebenso überlebten die TNF KO Mäuse, die kein TNF exprimieren. In den als Wildtyp verwendeten C57Bl/6 Mäusen, die kein humanes sondern das ursprüngliche murine TNF exprimieren, zeigte 500 µg Monomer keine protektive Wirkung. Somit zeigen sowohl monomeres als auch dimeres ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag eine hTNF neutralisierende Aktivität *in vivo* und verhindern den Tod der hTNF transgenen Mäuse.

5.2 Expression eines aktiven anti-hTNF-VHH-ELP (*elastin-like polypeptide*) Fusionsproteins in Tabakpflanzen

5.2.1 Herstellung von ^{Ec}anti-hTNF-VHH-100xELP in *E. coli*

5.2.1.1 Klonierung von ^{Ec}anti-hTNF-VHH-100xELP in einen *E. coli* Expressionsvektor

Um ^{Ec}anti-hTNF-VHH-100xELP in *E. coli* zu exprimieren, wurde das Expressionsplasmid pet23a(+)-pelB-anti-hTNF-VHH-ELP-myc-his erstellt. Dafür wurde die für das *elastin-like polypeptide* (100xELP) kodierende cDNA zwischen *Nanobody* und „c-myc tag“ in pet23a(+)-pelB-anti-hTNF-VHH-myc-his über eine *Not* I Schnittstelle eingefügt. Aus klonierungstechnischen Gründen besitzt ^{Ec}anti-hTNF-VHH-100xELP zwei „c-myc tags“. Die

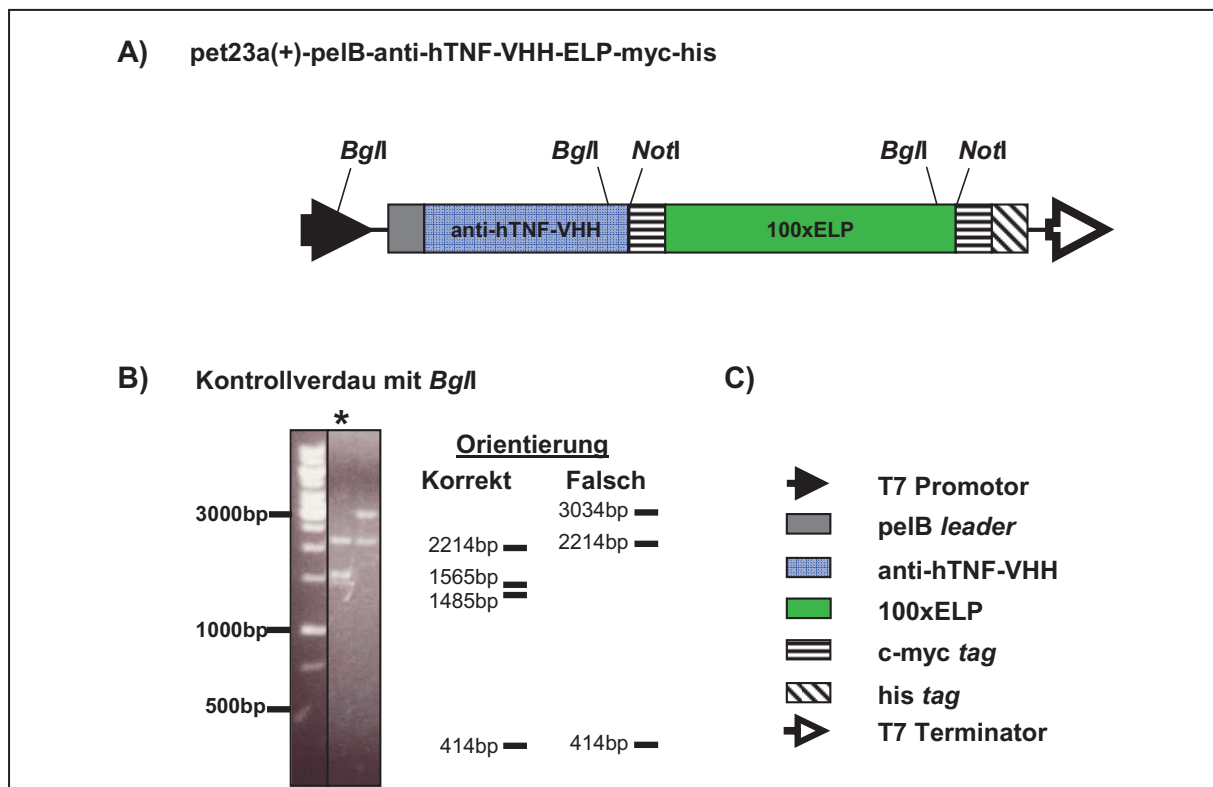


Abb. 5-19 Expressionskassette von ^{Ec}anti-hTNF-VHH-100xELP in *E. coli*

A) Übersicht der Expressionskassette des Plasmids pet23a(+)-pelB-anti-hTNF-VHH-100xELP-myc-his. Durch die „pelB leader Sequenz“ wird das Protein in den periplasmatischen Raum exprimiert, von wo es in den Zellkulturüberstand gelangt. Der C-terminale „c-myc tag“ ermöglicht die Nachweisbarkeit des Proteins mit immunochemischen Methoden. Der „his-tag“ dient der Reinigung des Fusionsproteins mittels Nickel-NTA Affinitätschromatographie. B) Kontrolle der Orientierung der 100xELP-kodierenden Sequenz in verschiedenen transformierten Bakterienklonen mit *Bgl*I Kontrollrestriktionsverdau - anbei eine schematische Darstellung der Fragmentgröße bei falscher und korrekter (*) Orientierung C) Legende der Expressionskassette in A.

Orientierung der 100xELP-Sequenz wurde durch einen Kontrollrestriktionsverdau mit *Bgl*I überprüft (Abb. 5-19).

Die Expressionskassette von pet23a(+)-pelB-anti-hTNF-VHH-ELP-myc-his entspricht denjenigen von pet23a(+)-pelB-anti-hTNF-VHH-myc-his und pet23a(+)-pelB-anti-hTNF-VHH-S-tag-myc-his (Abb. 5-1 – S. 41).

5.2.1.2 Expression von E_c anti-hTNF-VHH-100xELP in *E. coli* und seine Reinigung

Das Plasmid pet23a(+)-pelB-anti-hTNF-VHH-100xELP-myc-his wurde in den *E. coli* Stamm BL21 pLysS transformiert und die Proteinexpression durch IPTG induziert. Nach Induktion

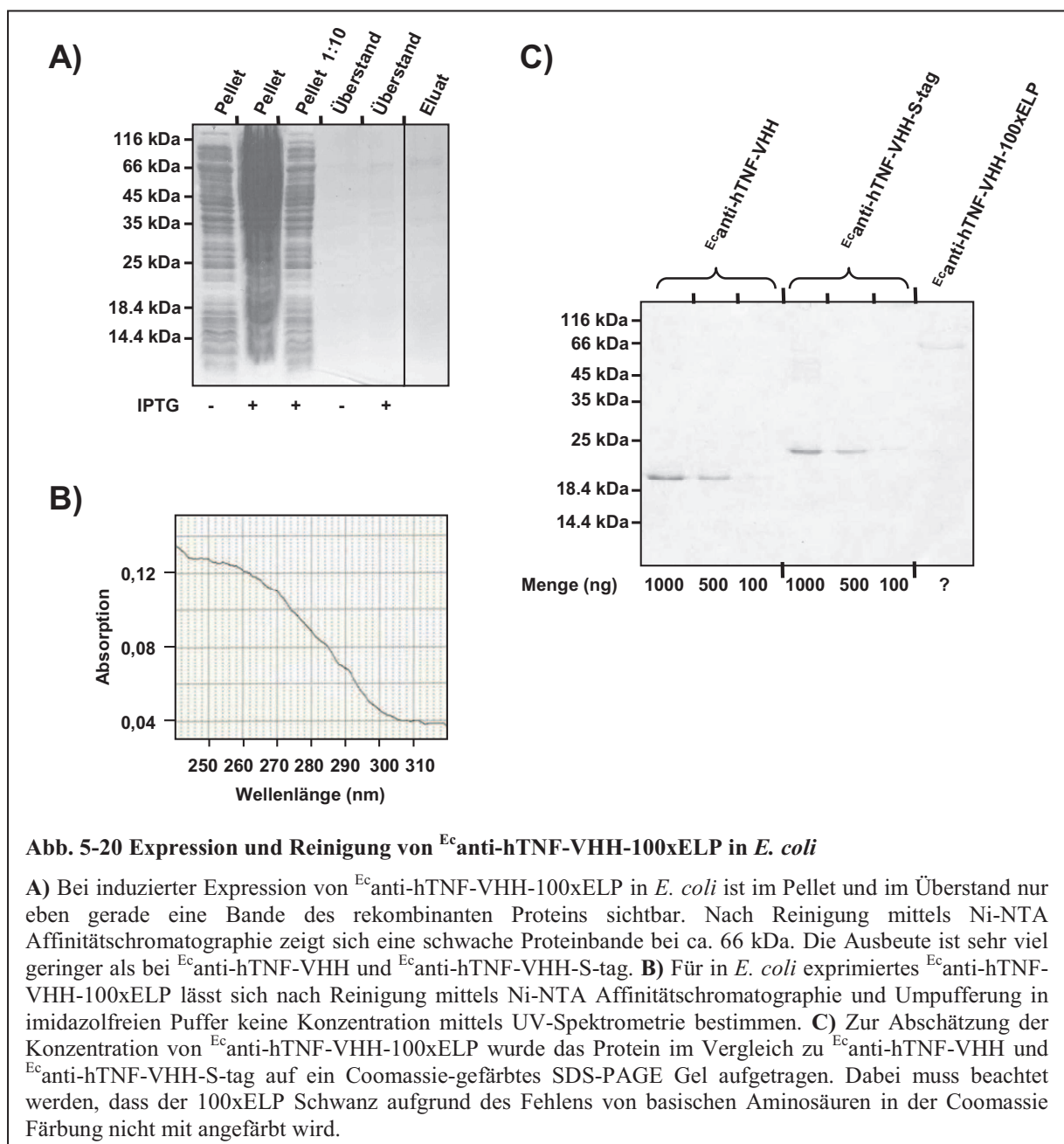


Abb. 5-20 Expression und Reinigung von E_c anti-hTNF-VHH-100xELP in *E. coli*

A) Bei induzierter Expression von E_c anti-hTNF-VHH-100xELP in *E. coli* ist im Pellet und im Überstand nur eben gerade eine Bande des rekombinanten Proteins sichtbar. Nach Reinigung mittels Ni-NTA Affinitätschromatographie zeigt sich eine schwache Proteinbande bei ca. 66 kDa. Die Ausbeute ist sehr viel geringer als bei E_c anti-hTNF-VHH und E_c anti-hTNF-VHH-S-tag. **B)** Für in *E. coli* exprimiertes E_c anti-hTNF-VHH-100xELP lässt sich nach Reinigung mittels Ni-NTA Affinitätschromatographie und Umpufferung in imidazolfreien Puffer keine Konzentration mittels UV-Spektrometrie bestimmen. **C)** Zur Abschätzung der Konzentration von E_c anti-hTNF-VHH-100xELP wurde das Protein im Vergleich zu E_c anti-hTNF-VHH und E_c anti-hTNF-VHH-S-tag auf ein Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE Gel aufgetragen. Dabei muss beachtet werden, dass der 100xELP Schwanz aufgrund des Fehlens von basischen Aminosäuren in der Coomassie Färbung nicht mit angefärbt wird.

ist im Coomassie-gefärbten SDS-PAGE Gel im Bakterienpellet und im Zellkulturüberstand nur eine sehr schwache Bande des ^{Ec}anti-hTNF-VHH-100xELPs erkennbar.

Nach Reinigung des Zellkulturüberstands mittels Ni-NTA Affinitätschromatographie lässt sich in den Elutionsfraktionen eine moderate Bande erkennen. Die Ausbeute an ^{Ec}anti-hTNF-VHH-100xELP ist im Vergleich zu ^{Ec}anti-hTNF-VHH und ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag sehr gering.

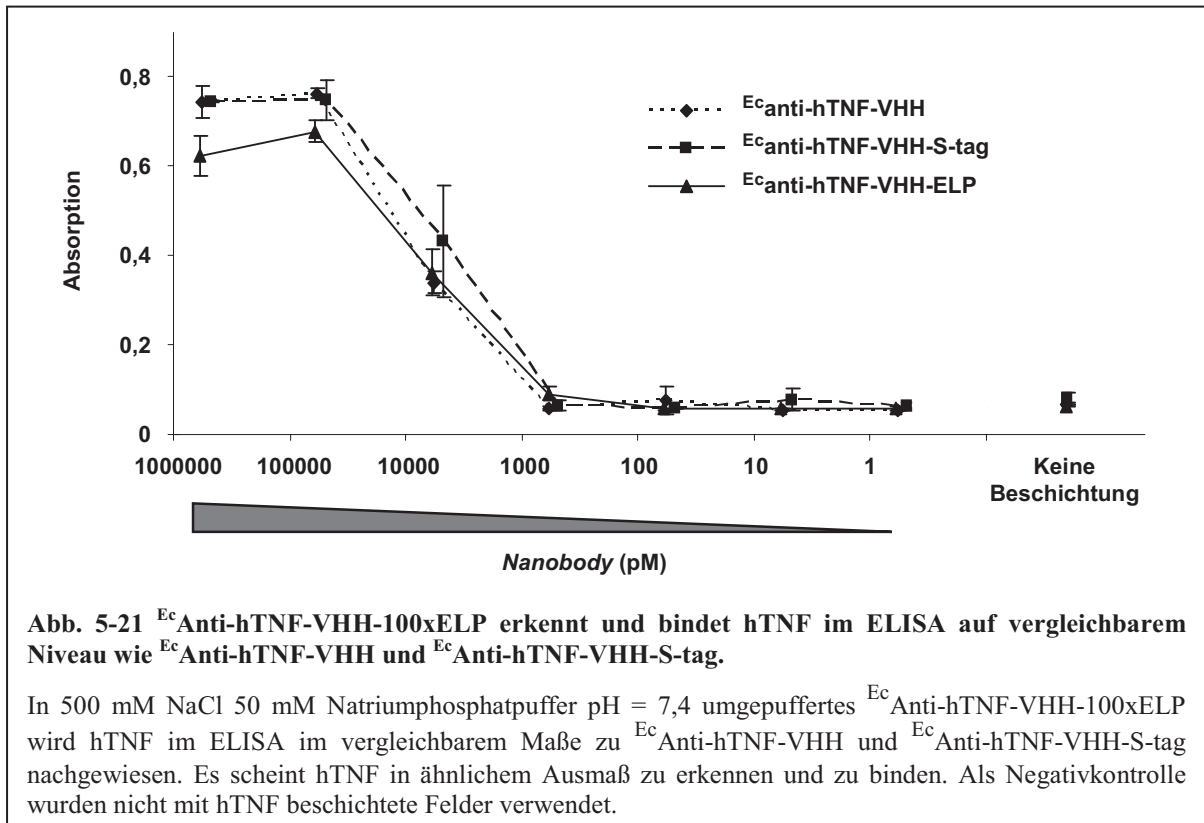
Eine Konzentrationsbestimmung durch UV-Spektrometrie war nicht möglich, da ^{Ec}anti-hTNF-VHH-100xELP kein proteintypisches Spektrogramm zeigte. Um trotzdem die Proteinkonzentration abschätzen zu können, wurde ^{Ec}anti-hTNF-VHH-100xELP im Vergleich zu verschiedenen Mengen ^{Ec}anti-hTNF-VHH und ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag auf ein SDS-PAGE Gel aufgetragen. Die sichtbare Bande besitzt grob geschätzt die zweifache Intensität der 100 ng ^{Ec}anti-hTNF-VHH Bande. Der 100xELP-Schwanz des ^{Ec}anti-hTNF-VHH-100xELP wird aufgrund fehlender basischer Aminosäuren (100x VPGXG X=A,V,G; V=Valin, P=Prolin, G=Glycin, A=Alanin) in der Coomassie-Färbung nicht angefärbt (Tal *et al.* 1985). (Der zweite „c-myc tag“ wird bei dieser groben Überschlagsrechnung ignoriert.) Folglich entsprechen bei Banden gleicher Intensität 100 ng ^{Ec}anti-hTNF-VHH (17,3 kDa) grob 340 ng ^{Ec}anti-hTNF-VHH-100xELP (58,8 kDa). Die aufgetragene Menge an ^{Ec}anti-hTNF-VHH-100xELP beträgt demnach näherungsweise 600-700 ng. Bei Reinigung von 1 Liter Zellkulturüberstand durch 3-maliges Aufreinigen über eine 1 ml Ni-NTA Affinitätschromatographiesäule betrug die Ausbeute an ^{Ec}anti-hTNF-VHH-100xELP geschätzt 120 µg. Im Vergleich dazu waren es nach der gleichen anfänglich genutzten Reinigungsmethode 8,4 mg ^{Ec}anti-hTNF-VHH bzw. 4,6 mg und ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag. Ein Grund für diese Differenz waren neben dem geringeren Expressionslevel starke Verluste bei der Umpufferung in imidazolfreien Puffer, die nur bei ^{Ec}anti-hTNF-VHH-100xELP auftraten. (Daten nicht gezeigt.)

5.2.2 Testung von in *E. coli* hergestelltem ^{Ec}anti-hTNF-VHH-100xELP

5.2.2.1 In *E. coli* hergestelltes ^{Ec}anti-hTNF-VHH-100xELP bindet in ähnlichem Ausmaß wie ^{Ec}anti-hTNF-VHH und ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag an hTNF im ELISA

^{Ec}anti-hTNF-VHH-100xELP erkennt und bindet hTNF im ELISA und zeigt eine Nachweisbarkeit in derselben Größenordnung wie ^{Ec}anti-hTNF-VHH und ^{Ec}anti-hTNF-VHH

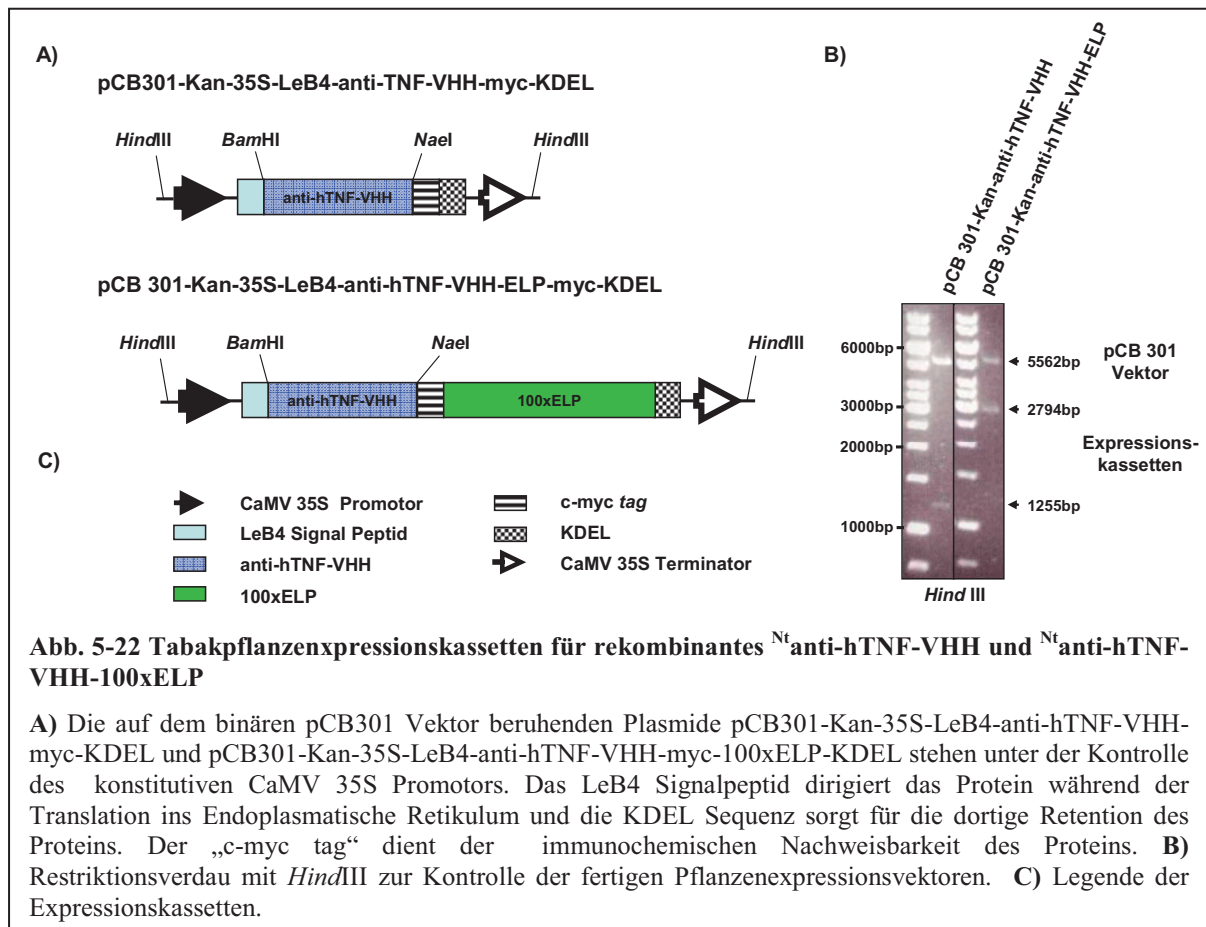
(Abb. 5-21). Als Negativkontrolle wurden nicht mit hTNF beschichtete Felder verwendet. (Da es sich bei dem ELISA um erste Aktivitätstests handelt, sind alle drei Proteine in 500 mM NaCl 50 mM Natriumphosphatpuffer pH = 7,4 umgepuffert und nur über Ni-NTA Affinitätschromatographie gereinigt.)



5.2.3 Herstellung von ^{Nt}anti-hTNF-VHH und ^{Nt}anti-hTNF-VHH-100xELP in Tabakpflanzen

5.2.3.1 Klonierung von ^{Nt}anti-hTNF-VHH und ^{Nt}anti-hTNF-VHH-100xELP in einen Tabakpflanzen-Expressionsvektor

Für die Erzeugung von ^{Nt}anti-hTNF-VHH wurde die für anti-hTNF-VHH kodierende cDNA Sequenz in den Vektor pRTRA7/3 (Artsaenko *et al.* 1995; Scheller *et al.* 2001) eingefügt, der eine Tabakpflanzenexpressionskassette enthält. Für ^{Nt}anti-hTNF-VHH-100xELP wurde ein pRTRA7/3 Vektor ausgewählt, der bereits die 100xELP-Sequenz enthielt (Scheller *et al.* 2004). Die resultierenden Vektoren wurden pRTRA7/3-35S-LeB4-anti-hTNF-VHH-myc-KDEL und pRTRA7/3-35S-LeB4-anti-hTNF-VHH-myc-100xELP-KDEL getauft. Die



Expressionskassetten stehen unter Kontrolle des konstitutiven cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S Promotors für ubiquitäre Expression des rekombinanten Proteins, unter anderem auch in den Blättern der Tabakpflanze (Odell *et al.* 1985; Conrad *et al.* 1998). N-terminal schließt sich an den Nanobody ein Legumin B4 (LeB4) Signalpeptid an, welches für die Translokation in das Endoplasmatische Retikulum verantwortlich ist, wo es kotranslational durch Signalpeptidasen abgeschnitten wird (Baumlein *et al.* 1986). Die das rekombinante Protein am C-Terminus abschließende KDEL Sequenz führt zur Retention der Proteine im Endoplasmatischen Retikulum (Munro und Pelham 1987). Der „c-myc tag“ sorgt für die immunochemische Nachweisbarkeit der Proteine (Munro und Pelham 1987). Die Pflanzenexpressionskassetten (CaMV 35S Promotor / LeB4 SP / anti-hTNF-VHH / c-myc tag / KDEL / CaMV 35S Terminator und CaMV 35S Promotor / LeB4 SP / anti-hTNF-VHH / c-myc tag / 100xELP / KDEL / CaMV 35S Terminator) wurden dann mittels *Hind*III Schnittstellen in den binären pCB301-Kan (Gahrtz und Conrad 2009a) kloniert. Die auf pCB301 beruhenden erzeugten Vektoren (Xiang *et al.* 1999) wurden pCB301-Kan-35S-LeB4-anti-hTNF-VHH-myc-KDEL und pCB301-Kan-35S-LeB4-anti-hTNF-VHH-myc-100xELP-KDEL genannt (Abb. 5-22).

5.2.3.2 Expression von ^{Nt}anti-hTNF-VHH und ^{Nt}anti-hTNF-VHH-100xELP in Tabakpflanzen

5.2.3.2.1 Testexpression von ^{Nt}anti-hTNF-VHH und ^{Nt}anti-hTNF-VHH-100xELP in transient transfizierten Tabakblättern

Tabakblätter wurden transient transfiziert durch Agroinfiltration mit *Agrobacterium tumefaciens*, welches zuvor durch Elektroporierung mit pCB301-Kan-35S-LeB4-anti-hTNF-VHH-myc-KDEL bzw. pCB301-Kan-35S-LeB4-anti-hTNF-VHH-myc-100xELP-KDEL transformiert wurde. In der Kontrolle mittels Western Blot exprimieren die transgenen Tabakblattscheiben nach einigen Tagen ^{Nt}anti-hTNF-VHH und ^{Nt}anti-hTNF-VHH-100xELP (Abb. 5-23). Als Positivkontrolle wurde ein *single-chain fragment variable* Antikörper (scFv) gegen kresoxim-methyl (scFv anti-Kres) mit ca. 30 kDa verwendet (Scheller *et al.* 2006).

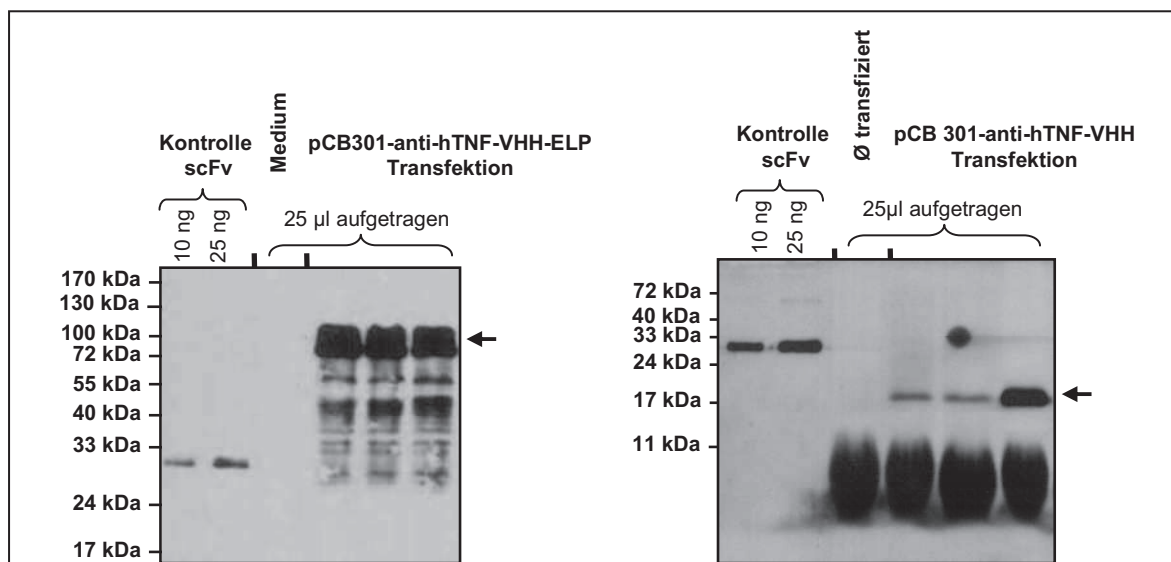


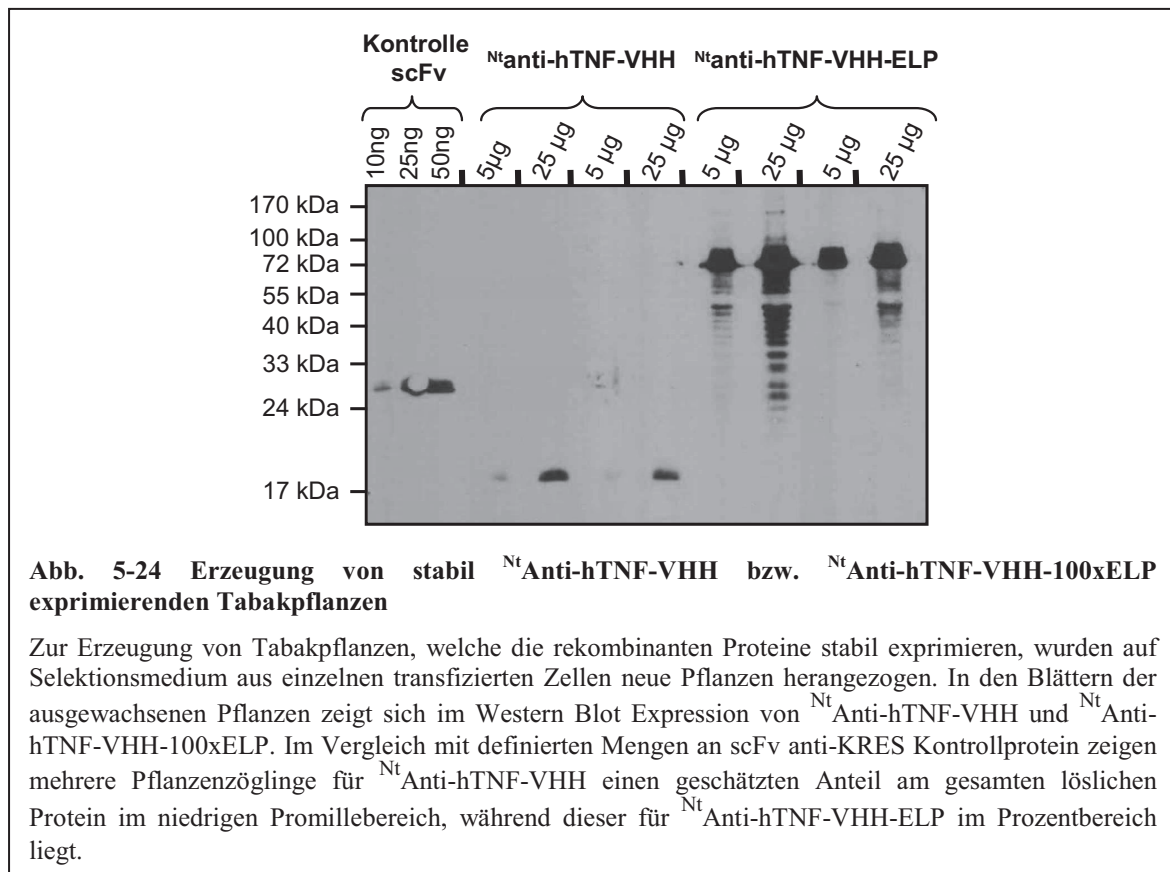
Abb. 5-23 Testexpression von ^{Nt}anti-hTNF-VHH und ^{Nt}anti-hTNF-VHH-100xELP in mittels Agroinfiltration transient transfizierten Tabakblättern

Über mit pCB301-Kan-35S-LeB4-anti-hTNF-VHH-myc-KDEL und pCB301-Kan-35S-LeB4-anti-hTNF-VHH-myc-100xELP-KDEL transformiertem *Agrobacterium tumefaciens* wurden Tabakblätter mittels Agroinfiltration transient transfiziert. Im gegen den "c-myc tag" gerichteten Western Blot an Blattlysaten zeigt sich für beide Proteine jeweils in mehreren Blattscheiben eine Expression. Als Positivkontrolle wurde ein „*single-chain fragment variable*“ Antikörperfragment (scFv) gegen kresoxim-methyl (scFv anti-KRES) mit ca. 30 kDa verwendet.

^{Nt}anti-hTNF-VHH besitzt ohne die abgeschnittene LeB4 Signalsequenz ein Molekulargewicht von 16.7 kDa und läuft im SDS-Gel ungefähr auf dieser Höhe. ^{Nt}anti-hTNF-VHH-100xELP läuft etwas höher als sein Molekulargewicht von 57.1 kDa, was bereits mehrfach für ELP-Fusionsproteine vorbeschrieben wurde (Shimazu *et al.* 2003; Floss *et al.* 2008).

5.2.3.2.2 Expression von ^{Nt}anti-hTNF-VHH und ^{Nt}anti-hTNF-VHH-100xELP in stabil transfizierten Tabakpflanzen

Auf "Murashige and Skoog" (MS) Medium mit Kanamycin zur Selektion wurden nach Transfektion von Tabakblattscheiben mittels *Agrobacterium tumefaciens* aus einzelnen transgenen Zellen stabil transfizierte Tabakpflanzen herangezogen. Die Western Blot Kontrolle der Tabakblätter von ausgewachsenen Pflanzen zeigt sowohl ^{Nt}anti-hTNF-VHH als auch ^{Nt}anti-hTNF-VHH-100xELP Expression (Abb. 5-24). Wie für andere Proteine vorbeschrieben (Scheller *et al.* 2006; Floss *et al.* 2010; Conley *et al.* 2011) ist die Menge an exprimiertem rekombinanten 100xELP-Fusionsprotein deutlich höher als für ^{Nt}anti-hTNF-VHH ohne 100xELP.

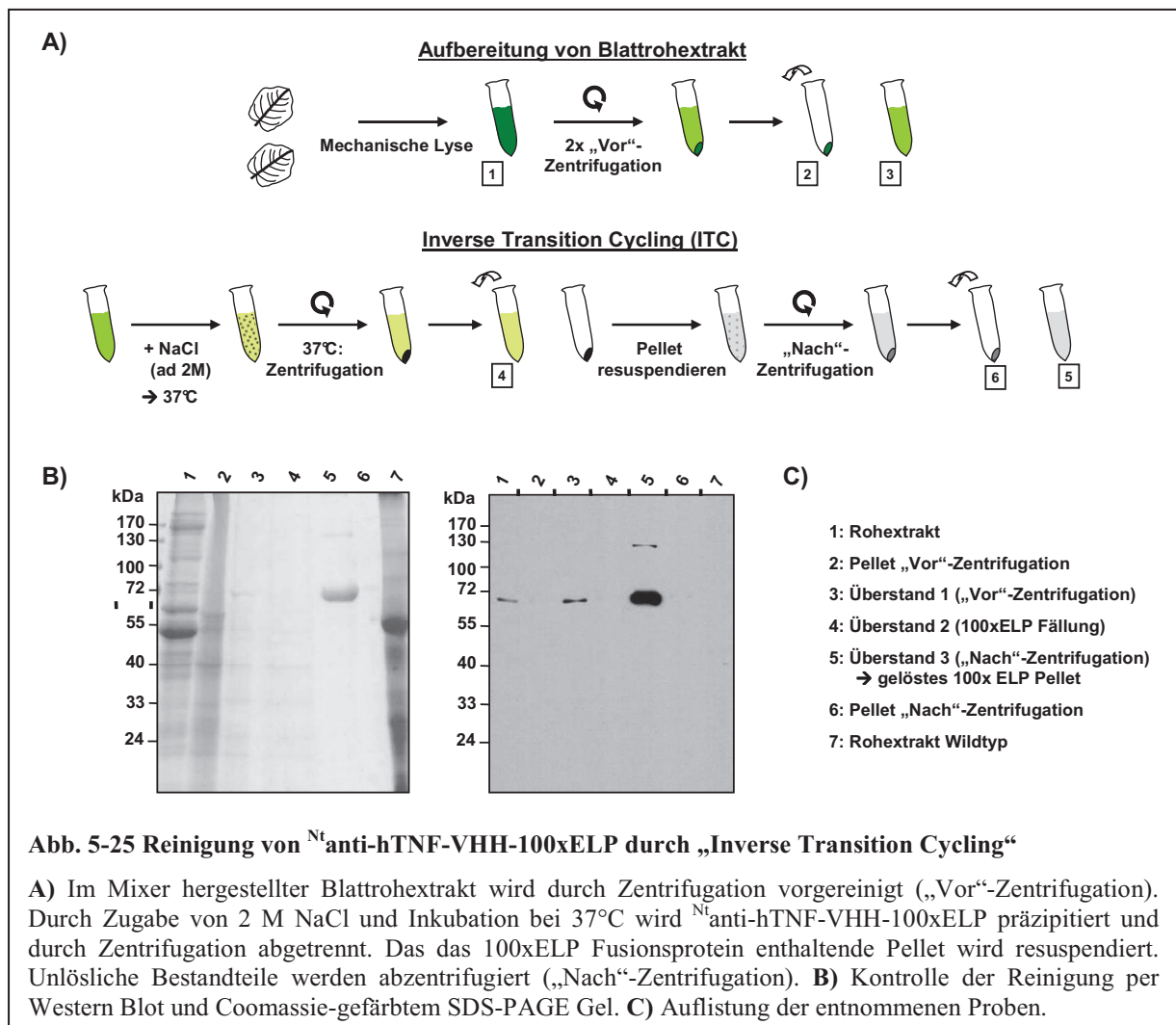


Im Vergleich mit den definierten Mengen an scFv anti-KRES Kontrollprotein (Scheller *et al.* 2006) (siehe 5.2.3.2.1 – S. 67) ergibt sich in den ^{Nt}anti-hTNF-VHH exprimierenden Tabakpflanzen bei 25 µg löslichem Gesamtprotein unter grober Annahme gleicher Proteingröße eine geschätzte Menge von ca. 25 ng ^{Nt}anti-hTNF-VHH, was einem Anteil von einer Größenordnung um 0,1% entspricht. In ^{Nt}anti-hTNF-VHH-100xELP transgenen Pflanzen ist die Bande bei 5 µg löslichem Gesamtprotein deutlich stärker als 50 ng

Kontrollprotein. Damit liegt die Menge an rekombinantem Protein deutlich über 100 ng (N^t anti-hTNF-VHH-100xELP ist mit 57.1 kDa ca. doppelt so groß wie scFv anti-Kres (30 kDa)). Das entspricht einem Anteil des rekombinanten Proteins am löslichen Gesamtprotein in der Größenordnung von Prozent (Schätzung: >2%).

5.2.3.3 Reinigung von N^t anti-hTNF-VHH und N^t anti-hTNF-VHH-100xELP aus Tabakpflanzen

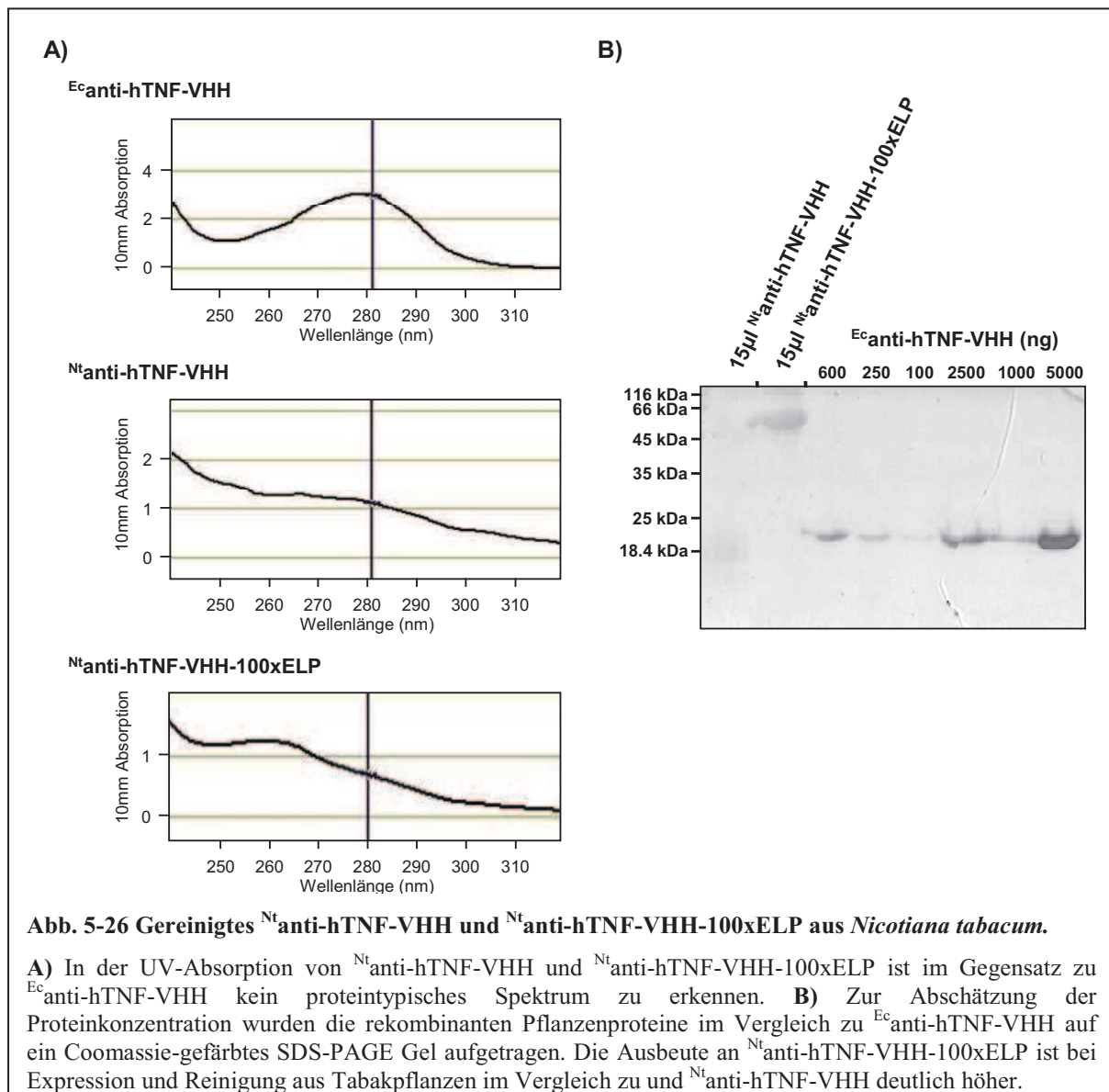
Mittels *inverse transition cycling* (ITC) lässt sich N^t anti-hTNF-VHH-100xELP aufgrund der schlechten Löslichkeit des 100xELPs bei hohen Temperaturen und hohen Salzkonzentrationen effizient aus Tabakblattextrakt aufreinigen (Meyer und Chilkoti 1999). Bei hoher Salzkonzentration und Temperaturen oberhalb der „Transitionstemperatur“ (2 M



NaCl und 37°C) wird N^t anti-hTNF-VHH-100xELP unlöslich und aggregiert und kann infolge dessen durch Zentrifugation abgetrennt werden (Abb. 5-25).

Bei N_t anti-hTNF-VHH besteht diese Möglichkeit nicht. Deswegen wurde es mittels Affinitätschromatographie an anti-c-myc Säulen gereinigt (Daten nicht gezeigt).

In der UV-Absorption von N_t anti-hTNF-VHH und N_t anti-hTNF-VHH-100xELP ist im Gegensatz zu E_c anti-hTNF-VHH kein proteintypisches Spektrum zu erkennen (Abb. 5-26). Zur groben ersten Abschätzung der Proteinkonzentration wurden die rekombinanten Pflanzenproteine im Vergleich zu E_c anti-hTNF-VHH auf ein Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE Gel aufgetragen.



Die N_t anti-hTNF-VHH-100xELP Bande entspricht in ihrer Stärke am ehesten der 2,5 µg Bande des E_c anti-hTNF-VHH. N_t anti-hTNF-VHH-100xELP hat ein Molekulargewicht von 57,1 kDa und E_c anti-hTNF-VHH eins von 17,3 kDa. Da allerdings die Proteine des 100xELP-Schwanzes in der Coomassie-Färbung nicht angefärbt werden (siehe 5.2.1.2 – S. 63) (Tal *et*

al. 1985), entspricht die Anfärbarkeit von 2,5 µg ^{Ec}anti-hTNF-VHH ungefähr der von 8,25 µg ^{Nt}anti-hTNF-VHH-100xELP. Bei einer Auftragsmenge von 15 µl Probe entspräche das einer überschlagenen Konzentration von 0,5 mg/ml. Die ^{Nt}anti-hTNF-VHH (16,7 kDa) Bande entspricht stärkenmäßig am ehesten der 250 ng Bande des ^{Ec}anti-hTNF-VHH (17,3 kDa). Daraus ergäbe sich eine grob überschlagene Konzentration von 0,02 mg/ml. (Die Massen der beiden Proteine wurden näherungsweise als gleich angenommen.) (Das Vorhandensein eines his-tags in ^{Ec}anti-hTNF-VHH im Gegensatz zu beiden rekombinanten Pflanzenproteinen wird bei dieser groben Überschlagsrechnung nicht berücksichtigt.)

Die Laufhöhe des ^{Nt}anti-hTNF-VHH ungefähr auf Höhe der 18,4 kDa Bande liegt nahe seinem tatsächlichen Molekulargewicht (16,7 kDa). ^{Nt}anti-hTNF-VHH-100xELP läuft unterhalb der 66 kDa Bande und damit ebenfalls ungefähr auf der Höhe seines Molekulargewichts von 57,1 kDa.

Die Ausbeute an erstem ^{Nt}anti-hTNF-VHH-100xELP ist bei Expression und Reinigung aus Tabakpflanzen im Vergleich zu und ^{Nt}anti-hTNF-VHH deutlich höher (Abb. 5-26).

5.2.4 Erste Vortestung von in Tabakpflanzen hergestelltem ^{Nt}anti-hTNF-VHH und ^{Nt}anti-hTNF-VHH-100xELP im L929-Zytotoxizitätsassay

5.2.4.1 ^{Nt}anti-hTNF-VHH-100xELP aus Tabakpflanzen besitzt hTNF neutralisierende Aktivität

In ersten Tests zeigte das in der Tabakpflanze hergestellte ^{Nt}anti-hTNF-VHH-100xELP im L929-Zellen Zytotoxizitätsassay eine hTNF neutralisierende Aktivität. Sie liegt bei aller Unsicherheit bei der Konzentrationsschätzung (siehe oben: 5.2.3.3) zumindest größenordnungstechnisch in einem ähnlichen Bereich wie für in *E. coli* produziertem ^{Ec}anti-hTNF-VHH (Abb. 5-27).

5.2.4.2 ^{Nt}anti-hTNF-VHH aus Tabakpflanzen zeigt qualitativ hTNF neutralisierende Aktivität

Erste Tests des ^{Nt}anti-hTNF-VHH aus Tabakpflanzen wurden nur qualitativ durchgeführt. Deshalb wurden zur Untersuchung der hTNF neutralisierenden Fähigkeit des ^{Nt}anti-hTNF-VHH unterschiedliche Volumina einer das Protein enthaltenden Probe als hTNF blockierendes Agens zu einem Zytotoxizitätsassay hinzugefügt.

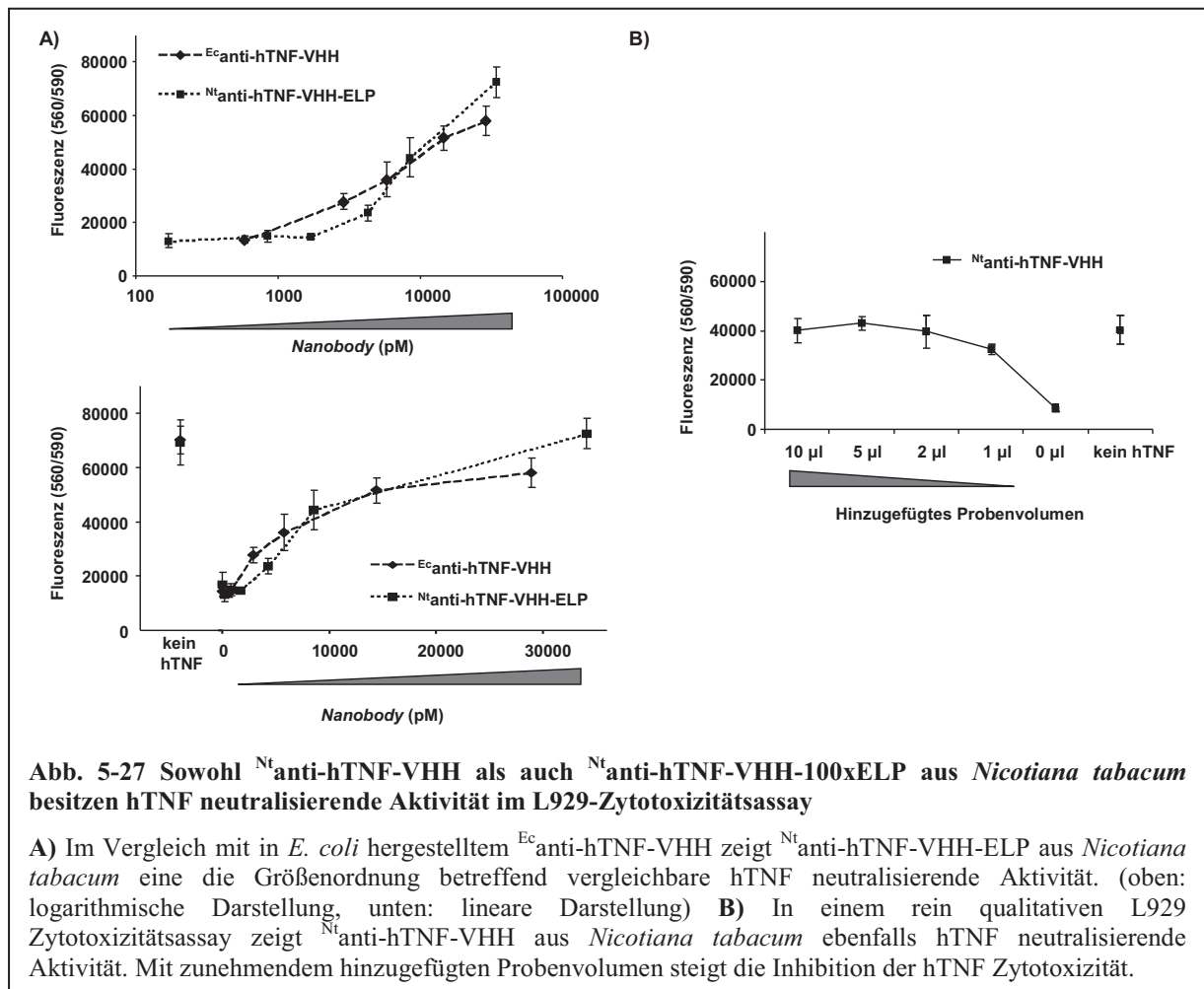


Abb. 5-27 Sowohl *Nt*anti-hTNF-VHH als auch *Nt*anti-hTNF-VHH-100xELP aus *Nicotiana tabacum* besitzen hTNF neutralisierende Aktivität im L929-Zytotoxizitätsassay

A) Im Vergleich mit in *E. coli* hergestelltem *Ec*anti-hTNF-VHH zeigt *Nt*anti-hTNF-VHH-ELP aus *Nicotiana tabacum* eine die Größenordnung betreffend vergleichbare hTNF neutralisierende Aktivität. (oben: logarithmische Darstellung, unten: lineare Darstellung) **B)** In einem rein qualitativen L929 Zytotoxizitätsassay zeigt *Nt*anti-hTNF-VHH aus *Nicotiana tabacum* ebenfalls hTNF neutralisierende Aktivität. Mit zunehmendem hinzugefügten Probenvolumen steigt die Inhibition der hTNF Zytotoxizität.

Das in Pflanzen hergestellte *Nt*anti-hTNF-VHH zeigt ebenfalls eine dosisabhängige hTNF inhibierende Aktivität. Mit steigenden Mengen an hinzugefügter Probe lässt sich die Zytotoxizität von hTNF auf L929 Zellen zunehmend hemmen (Abb. 5-27).

Unter Annahme der geschätzten Konzentration von 0,02 mg/ml würden die *Nt*anti-hTNF-VHH Konzentrationen bei 2 µg/ml, 1 µg /ml, 500 ng/ml und 250 ng/ml liegen. Damit wäre auch bei *Nt*anti-hTNF-VHH eine größenordnungstechnisch mit dem rekombinanten Protein aus *E. coli* vergleichbare hTNF neutralisierende Aktivität vorhanden. (*Ec*anti-hTNF-VHH erreicht einen ersten Sättigungseffekt bei 250 ng/ml, während 100 ng/ml noch nicht ausreichend hTNF neutralisieren (vergleiche Abb. 5-12).)

6 Diskussion

6.1 Antikörpertherapien und die Notwendigkeit zur Kostensenkung

Antikörper sind ein zentraler Baustein unseres Immunsystems. Aufgrund ihrer großen Spezifität ist der einzelne Antikörper eine hochpräzise „Lenkwaffe“, während die Gesamtheit der Antikörper aufgrund ihrer nahezu unbegrenzten Diversität einen erworbenen breiten Schutzschild gegen eine Vielzahl unterschiedlicher Bedrohungen darstellt. Ihre beiden grundlegenden Aufgaben bestehen in der Neutralisierung z.B. potentiell toxischer Antigene und in der Herbeiführung von Effektorfunktionen des Immunsystems mittels ihres Fc-Teils (Opsonierung für Zellen wie Makrophagen und Natürliche Killerzellen sowie Aktivierung der Komplementkaskade).

Aufgrund ihrer unübertroffenen Spezifität werden monoklonale Antikörper zunehmend als therapeutisches Agens eingesetzt. Zum einen als präziser Neutralisator z.B. unerwünschter Botenstoffe oder ihrer Wirkungen, zum anderen als Lenkwaffe mit nachfolgenden Effektoren. Diese Effektoren können zum Beispiel bei gegen B-Zellen gerichteten Antikörpern aus körpereigenen bestehen (Rituximab) oder aus externen wie z.B. Radionukleotiden (Ibritumomab) (Reichert und Valge-Archer 2007).

Therapeutische monoklonale Antikörper stellen das am schnellsten wachsende Segment der pharmazeutischen Industrie dar (Ledford 2008). Seit der ersten Zulassung vor 25 Jahren wächst besonders in den letzten Jahren die Zahl der auf dem Markt befindlichen Produkte rasant. 2010 waren insgesamt bereits über 25 monoklonale Antikörper zugelassen und dazu sind zur Zeit die Hälfte aller in Entwicklung befindlichen Medikamente Antikörper (An 2010). Welche enorme ökonomische Bedeutung dieses Feld besitzt, zeigen Vorhersagen für 2012, in denen unter den 10 Medikamente mit den höchsten Umsatzzahlen vorraussichtlich 6 Antikörper oder Antikörper-ähnliche Proteine sein werden (NATURE-MEDICINE 2012). Ein Problem der monoklonalen Antikörper sind jedoch ihre aufwendige Produktion und die damit verbundenen enormen Kosten (Kolkman und Law 2010). Einige Berechnungen sagen vorher, dass das Gesundheitssystem sich nicht alle dieser teuren neuen Medikamente leisten könnte, selbst wenn sie verfügbar wären (Dübel 2007; Drucker *et al.* 2008). Eine der zentralen Aufgaben besteht deshalb schon jetzt in der Kostensenkung bei der Antikörperherstellung - vom Expressionssystem über die Reinigung bis hin zur Lagerung. Für klassische Antikörper

stellen insbesondere Expressionssysteme wie Pflanzen aber auch transgene Tiere (Milch / Eier) Möglichkeiten dar. Eine weitere Alternative sind Antikörperfragmente, kleinere Moleküle, welche z.B. in Mikroorganismen hergestellt werden können (An 2010).

6.2 Verknüpfung von ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag mittels Mikrobieller Transglutaminase (MTG)

6.2.1 Hintergründe

6.2.1.1 Tumor Nekrose Faktor

Tumor Nekrose Faktor (TNF) spielt eine wichtige Rolle vor allem im angeborenen Immunsystem (Hehlhans und Pfeffer 2005) und hat eine potente proinflammatorische Wirkung (Löffler 2003), sowohl auf lokaler als auch auf systemischer Ebene (Murphy *et al.* 2008b). Aufgrund seiner hohen biologischen Potenz ist TNF, wie viele Botenstoffe des Körpers, ein zweischneidiges Schwert – eine Fehlregulation führt zu einer Reihe teilweise bedrohlicher Krankheitsbilder: bei lokalen Infekten ist TNF für Begrenzung der Keimausbreitung notwendig, bei systemischen Infektionen ist es ein wichtiger pathogenetischer Faktor des septischen Schocks (Hehlhans und Pfeffer 2005; Murphy *et al.* 2008b).

Ebenso spielt TNF eine wichtige Rolle bei einer Reihe von chronischen Autoimmunkrankheiten wie Morbus Crohn, Rheumatoider Arthritis und der Psoriasis (Hehlhans und Pfeffer 2005). Für diese und weitere Krankheitsbilder sind bereits eine Reihe von TNF-Antagonisten, basierend auf monoklonalen Antikörpern, sogenannte *biologicals*, auf dem Markt. Sie bieten z.B. Patienten mit schweren Verläufen vor allem von Rheumatoider Arthritis aber auch von Morbus Crohn Hoffnung, bei denen andere Medikamente nicht mehr wirken (Karow 2009a; Herold 2010), sind allerdings sehr teuer (ca. 20.000 €/J (KBV 2010)). Tab. 6-1 gibt eine kurze Übersicht zu zugelassenen TNF-Antagonisten und ihren Indikationen.

monoklonale Antikörper		Indikationen
Infliximab (Remicade [®]) (Janssen-Biologics 2009a)	chimärer (murin/human) monoklonaler Antikörper (IgG1)	Rheumatoide Arthritis M. Bechterew M. Crohn Colitis ulcerosa Psoriasis/Psoriasis Arthritis
Adalimumab (Humira [®]) (Abbott-Laboratories 2011)	humaner monoklonaler Antikörper (IgG1)	Rheumatoide Arthritis polyartikuläre juv. idiopath. Arthritis M. Bechterew M. Crohn Psoriasis/Psoriasis Arthritis
Golimumab (Simponi [®]) (Janssen-Biologics 2009b)	humaner monoklonaler Antikörper (IgG1κ)	Rheumatoide Arthritis M. Bechterew Psoriasis Arthritis
Certolizumab pegol (CIMZIA [®]) (Tracey <i>et al.</i> 2008; UCB- Pharma 2010; UCB 2011)	PEG-yliertes humanisiertes monoklonales Fab-Fragment (IgG1 - murine CRDs)	Rheumatoide Arthritis M. Crohn (US)
Rezeptorkonstrukt		
Etanercept (Enbrel [®]) (Pfizer 2009)	TNFR2-Fc Konstrukt (hTNFR2- Ligandenbindungsdomäne und humane IgG1 Fc- Domäne)	Rheumatoide Arthritis polyartikuläre juv. idiopath. Arthritis Psoriasis Arthritis M. Bechterew Psoriasis

Tab. 6-1 Zugelassene TNF Antagonisten und ihre Indikationen (vergleiche zusammenfassend (An 2010)).

6.2.1.2 Single-domain Antikörper (Nanobodies)

Generell existiert ein Trend hin zu immer kleineren antigenbindenden Molekülen (Pluckthun und Pack 1997), welcher sich in Tab. 6-1 in Form der Fab-Fragmentes Certolizumab andeutet. Die geringe Größe bringt eine Reihe von Vorteilen mit sich: einfachere und billigere Produktion, neue Vielfalt an möglichen Fusionsproteinen, bessere Gewebepenetration und oft ein erhöhte Stabilität. Auf komplette Antikörpern folgten zunächst Fab-Fragmente, dann scFv

(*single-chain Fragment variable*), nur aus den durch einen Protein-*linker* verbundenen variablen Domänen der Schwer- und Leichtkette bestehend (siehe Abb. 3-2). Nanobodies als alleinige variable Domäne der Schwereketten führen diesen Trend konsequent weiter. Aus Kamel-Schwerkettenantikörpern hergestellt besitzen sie mit ca. 15 kDa nur ein Zehntel der Größe eines konventionellen Antikörpers (150 kDa) (Arbabi Ghahroudi *et al.* 1997; An 2010; Kolkman und Law 2010).

Einer der zentralen Vorteile ist, dass sich Nanobodies aufgrund ihrer geringen Größe problemlos in hohen Mengen in Mikroorganismen exprimieren lassen, was die Produktionskosten auch heute noch um Faktor 2-3 gegenüber in Säugetierzellen hergestellten Antikörpern senkt (Kolkman und Law 2010). Darüber hinaus sind Nanobodies außerordentlich stabil (Kolkman und Law 2010), womit die Lagerung theoretisch sogar ohne Kühlung bei Raumtemperatur möglich ist (Gibbs 2006; Kolkman und Law 2010). Sie eröffnet auch für Antikörper vollkommen neuartige Applikationswege wie z.B. intranasal (Ibanez *et al.* 2011) oder rektal (Silence *et al.* 2007) und selbst nach Magen-Darmpassage sind Nanobodies noch aktiv, so dass eine orale Gabe bei gastrointestinalen Krankheiten möglich ist (Harmsen *et al.* 2006; van der Vaart *et al.* 2006). Aufgrund ihrer geringen Größe penetrieren sie deutlich besser ins Gewebe (z.B. für Tumorthherapie und -bildung von Vorteil) (Graff und Wittrup 2003; Huang *et al.* 2008; Tijink *et al.* 2008) und erreichen Epitope, die für klassische Antikörper nicht zugänglich sind wie z.B. aktive Zentren in Enzymen (Lauwereys *et al.* 1998) und versteckte konservierte Epitope (Wesolowski *et al.* 2009; Kolkman und Law 2010). Nanobodies ermöglichen damit nicht nur eine vollkommen neue Gattung von Enzyminhibitoren (Lauwereys *et al.* 1998; Marquardt *et al.* 2006) sondern auch Medikamente gegen bisher nicht oder nur schwer heilbare Krankheiten, die unter anderem aufgrund von Antigenvariation dem menschlichen Immunsystem entkommen (Stijlemans *et al.* 2004; Harmsen und De Haard 2007; Kolkman und Law 2010) wie auch HIV/AIDS (Harmsen und De Haard 2007; Forsman *et al.* 2008; Wesolowski *et al.* 2009).

Ihre geringe Größe erlaubt ihre Verwendung als modulare Bausteine zur Konstruktion von mehrvalenten und mehrspezifischen Nanobodies und anderen Fusionsproteinen (Enzyme, Chemo-/Radiotherapeutika, Toxine), was zu einer zusätzlichen Erweiterung der enormen Vielfalt an Einsatzmöglichkeiten führt (Muyldermans 2001; Wesolowski *et al.* 2009; Kolkman und Law 2010).

Die Serum-Halbwertszeit der Nanobodies in der Größenordnung von einer halben Stunde (Coppieters *et al.* 2006; Conrad *et al.* 2011) ist für einige Indikationen wie z.B. schnelle Toxinelimination (Hmila *et al.* 2008) oder radiologische Tumorbildgebung (Huang *et al.* 2008) von Vorteil. Zur langfristigen Anwendung z.B. bei chronisch entzündlichen Erkrankungen stellt dies allerdings einen bedeutenden Nachteil dar (Coppieters *et al.* 2006; Tijink *et al.* 2008; Kolkman und Law 2010). Für dieses Problem gibt es mehrere mögliche Ansätze (siehe auch 6.3.1 – S. 92) z.B. eine Dimerisierung, die das Problem zwar nicht löst, aber zumindest bessert. Dimere Nanobodies besitzen bereits eine höhere Halbwertszeit (Stunden) (Coppieters *et al.* 2006).

Der fehlende Fc-Teil des Nanobodies kann (Harmsen *et al.* 2007), muss aber die Wirksamkeit nicht einschränken, wie sich an den Ergebnissen von Certolizumab als PEG-yliertes Fab-Fragment bei der Rheumatoiden Arthritis zeigt und verringert darüber hinaus eventuell sogar unerwünschte Nebenwirkungen (An 2010; KBV 2010; UCB-Pharma 2010).

Das Risiko einer möglichen Immunogenität aufgrund der Herkunft aus Kamelen kann durch Humanisierung (Vincke *et al.* 2009; Wesolowski *et al.* 2009) minimiert werden, auch wenn Nanobodies bisher nur eine sehr geringe Immunogenität zeigten (Cortez-Retamozo *et al.* 2002; Coppieters *et al.* 2006; Kolkman und Law 2010).

Nanobodies vereinigen die Vorteile zweier verschiedener Medikamentenklassen in sich: wie kleine Moleküle sind sie relativ billig, stabil und können in Taschen (z.B. Enzyme) binden, besitzen aber dafür die Spezifität und Affinität monoklonaler Antikörpern mit dementsprechend geringerem Potential an Nebenwirkungen durch unerwünschte unspezifische Bindungen (Kolkman und Law 2010; Creative-Biolabs 2011). Aufgrund ihrer ebenfalls für die Selektion äußerst günstigen Eigenschaften ist es zudem innerhalb kürzester Zeit möglich, *single-domain* Antikörper mit neuen Spezifitäten herzustellen (Creative-Biolabs 2011; Ablynx-NV 2012).

Der aktuelle Forschungsstand bei Nanobodies ist vielversprechend: Nanobodies wurden im Tiermodell erfolgreich unter anderem gegen so verschiedene Krankheiten wie Rheumatoide Arthritis (Coppieters *et al.* 2006) und chronische Colitis (Silence *et al.* 2007), Krebs (Roovers *et al.* 2007), Diarrhoe (Harmsen *et al.* 2006; van der Vaart *et al.* 2006) und Vogelgrippe (Influenza Virus H5N1) (Ibanez *et al.* 2011) eingesetzt. Durch Hinzufügen einer Domäne mit Albuminspezifität wurde die Halbwertszeit deutlich verlängert (Coppieters *et al.* 2006;

Roovers *et al.* 2007) und darüber hinaus wurden Nanobodies entwickelt, die in der Lage sind die Bluthirnschranke zu überqueren (Muruganandam *et al.* 2002).

In der klinischen Entwicklung befinden sich zur Zeit 7 Nanobodies (Ablynx-NV 2012), wobei ein humanisierter *Nanobody* gegen hTNF (ATN-103) am weitesten fortgeschritten ist und vor kurzem erfolgreich eine klinische Phase II Studie in Patienten mit Rheumatoider Arthritis durchlaufen hat (Fleischmann *et al.* 2011).

Aufgrund der Entwicklung neuartiger Therapieansätze basierend auf der einfachen Herstellung neuer Spezifitäten sowie der kostengünstigen Produktion werden Nanobodies aller Voraussicht nach in der Medizin zukünftig eine nicht zu unterschätzende Bedeutung erlangen.

6.2.1.3 Mikrobielle Transglutaminase als posttranslationale Modifikationsalternative

Die Fusion von Proteinen mit Proteinen oder Nicht-Protein Anteilen ist weit verbreitet. Während die Bildung von Heterodimeren meist auf eine Kombination verschiedener Funktionen abzielt (z.B. (Kamiya *et al.* 2003a; Joosten *et al.* 2005)), führt die Bildung von Homodimeren oder –multimeren zu einer Aktivierung des Proteins (z.B. (Stuhlmann-Laeisz *et al.* 2006)) oder aber zu Aktivitätssteigerung durch Aviditätseffekte wie z.B. bei Antikörperfragmenten (Pluckthun und Pack 1997; Conrath *et al.* 2001; Coppieters *et al.* 2006; Kolkman und Law 2010).

Dabei gibt es chemische, enzymatische und molekulargenetische Vorgehensweisen. Die posttranslationale Modifizierung an angefügten spezifischen Zielpeptiden mittels Enzymen kombiniert dabei gewisse Vorteile der beiden anderen Verfahrens. Sie ist spezifisch, findet unter milden Bedingungen statt und umgeht mögliche Expressionsprobleme großer komplexer Proteinkonstrukte. Darüber hinaus ermöglicht sie auch das Anfügen von Nichtproteinanteilen. Ein Beispiel für ein solches Enzym ist die Mikrobielle Transglutaminase (MTG) (Takazawa *et al.* 2004; Tanaka *et al.* 2004; Abe *et al.* 2010).

Sie katalysiert die Bildung einer Isopeptidbindung zwischen einem Glutamin (Q) und bevorzugt Lysin (K) und führt je nach Wahl des angehängten *tags* zu Homo- oder Heterodimeren (Kamiya *et al.* 2003a; Kamiya *et al.* 2003b).

Die MTG besitzt eine Reihe von Eigenschaften, die sie als Enzym der für die posttranslationale Modifizierung generell sehr interessant macht: Sie ist anspruchslos (Abe *et al.* 2010) und aufgrund ihrer Aktivität bei 4°C in der Lage, Proteine unter äußerst schonenden Bedingungen zu verknüpfen (Kamiya *et al.* 2003b; Zhu und Tramper 2008). Zudem wird sie

in der Lebensmittelindustrie eingesetzt, so dass bereits Erfahrungen in der Verwendung in großem Maßstab vorhanden sind und sie kostengünstig zu erhalten ist (Kamiya *et al.* 2003a; Zhu und Tramper 2008; Buchert *et al.* 2010).

Auf der anderen Seite müssen einige Dinge beachtet werden: Ihre Spezifität ist nicht absolut. Generell bevorzugt sie flexible Proteinanteile als Substrat und hat ihre Schwierigkeiten mit globulären Proteinen (Kamiya *et al.* 2003a; Tagami *et al.* 2009; Buchert *et al.* 2010). Die Spezifität bezüglich des Acyl-Donors Glutamin ist auf Aminosäuren Ebene relativ hoch, während als Acyl-Akzeptor die Lysinseitenkette zwar bevorzugt wird, aber andere primäre Amine ebenso verwendet werden können (Kamiya *et al.* 2003b; Sugimura *et al.* 2008). Bei Mangel an primären Aminen kann die Transglutaminase sogar Glutamin zu Glutamat deamidieren, wodurch es nicht mehr als Reaktionspartner zur Verfügung steht (Tanaka *et al.* 2004; Buchert *et al.* 2010). Über die exakte Spezifität auf Aminosäuresequenzebene sowie die natürlichen Substrate ist nach wie vor relativ wenig bekannt, auch wenn kürzlich erste Konsensus Sequenzen für den Acyl-Donor Glutamin vorgeschlagen wurden (Sugimura *et al.* 2008; Tagami *et al.* 2009). Am ehesten stellt die Spezifität der Mikrobiellen Transglutaminase, wie bei anderen Enzymen vermutlich auch, ein Zusammenspiel aus lokaler ungefalteter und flexibler Proteinkonformation und Aminosäuresequenz dar (Fontana *et al.* 2008). Auch wenn für eine Vielzahl immer kürzer werdender Peptidanhänge an globulären Proteinen bereits eine spezifische Verknüpfung beschrieben wurde (Kamiya *et al.* 2003a; Sugimura *et al.* 2008; Abe *et al.* 2010; Moriyama *et al.* 2011), bleibt eine sorgfältige Auswahl des Proteins allerdings unerlässlich, um eine unselektive Quervernetzung aufgrund vorhandener intrinsischer Verknüpfungsstellen auszuschließen (Tanaka *et al.* 2004). Aufgrund der kompetitiven Deamidierung des Glutamins muss zudem in Abhängigkeit vom Zielpeptid die richtige Konzentration an Acyl-Akzeptoren gefunden werden, um eine effiziente Quervernetzung mit wenig Beiprodukt zu gewährleisten (Kamiya *et al.* 2003a; Tanaka *et al.* 2004).

Nanobodies wurden bereits vielfach molekulargenetisch mit anderen Proteinanteilen z.B. Enzymen, Signalmarkern etc fusioniert. Ein Kriterium dabei ist allerdings jeweils ihre Co-Exprimierbarkeit (Joosten *et al.* 2005; Baral *et al.* 2006; Bazl *et al.* 2007). Diese Limitierung könnte die MTG überwinden. Darüber hinaus wurden Nanobodies auch mit nicht proteinartigen Molekülen verknüpft wie z.B. PEG (Harmsen *et al.* 2007) oder Radionukliden (Huang *et al.* 2008). Auch hier könnte die MTG unter gewissen Voraussetzungen eine

einfache und effiziente Alternative darstellen (Kamiya *et al.* 2003b; Fontana *et al.* 2008; Kamiya *et al.* 2009; Mero *et al.* 2009; Abe *et al.* 2010). Unter Anwendung z.B. unidirektionaler *tags* und existierender spezifischer reversibler *tag*-Blocker (Kamiya *et al.* 2003b) wäre darüber hinaus eine Art modulares Baukastensystem vorstellbar, wodurch je nach Bedarf die erwünschten Bausteine mit einander kombiniert werden könnten (ähnlicher Ansatz: (Abe *et al.* 2010)).

6.2.1.3.1 Modellsystem Dimerisierung

Prinzipiell eignet sich die Mikrobielle Transglutaminase zur Modifizierung von Antikörperfragmenten - ohne auftretende Aktivitätsverluste, wie für scFv bereits gezeigt wurde (Kamiya *et al.* 2003a; Takazawa *et al.* 2004). Für Nanobodies wurde dies unseres Wissens bisher nicht gezeigt. Wir haben uns entschieden, die gut untersuchte Dimerisierung von Nanobodies zur Affinitätssteigerung als Modellsystem für die posttranslationale Verknüpfung von Nanobodies mittels MTG zu wählen (Conrath *et al.* 2001; Coppieters *et al.* 2006; Kolkman und Law 2010; Ibanez *et al.* 2011). Zumal zugunsten einer guten Vergleichbarkeit die Dimerisierung speziell für den für die Experimente verwendeten *Nanobody* bereits mit anderen Methoden beschrieben worden ist (Silence *et al.* 2007). Als Zielseptid fiel die Wahl auf ein sogenanntes *S-tag*, bestehend aus dem S-peptid der Ribonuklease A entschieden, welches die spezifische Homodimerisierung mittels MTG erlaubt (Kamiya *et al.* 2003b).

Unter den Vorraussetzungen unseres Modellsystems der Dimerisierung sind gewisse Argumente, die normalerweise für die Anwendung der MTG ausschlaggebend wären, aufgrund der besonderen Eigenschaften der Nanobodies nicht mehr von Belang. So benötigen diese aufgrund ihrer exzeptionellen Stabilität z.B. keine schonenden Temperaturen (Kolkman und Law 2010). Ebenso existieren bei höhervalenten Nanobodies keine Expressionsprobleme, welche eine posttranslationale Verknüpfung mittels Transglutaminase zu höhervalenten Komplexen notwendig machen würden (Cortez-Retamozo *et al.* 2002; Hmila *et al.* 2008). Selbst Tetramere lassen sich ohne eine gravierende Verminderung der Ausbeute problemlos in *E. coli* exprimieren (Silence *et al.* 2007). Auch wenn diese beiden Argumente in unserem speziellen Setting keine Rolle spielen, so können sie bei zukünftigen anspruchsvollen Fusionsprodukten z.B. mit komplexen und empfindlichen Enzymen oder anderen Proteinen von großer Bedeutung sein.

Die antigenbindende Region eines Nanobodies befindet sich innerhalb der Domäne tendenziell N-terminal. Deshalb ist es nicht überraschend, dass es für einige Nanobodies Berichte über Probleme nach Anfügen weiterer Proteine an den N-Terminus gibt (Conrath *et al.* 2001; Joosten *et al.* 2005; Hmila *et al.* 2008). Solche Probleme wären z.B. durch die Verknüpfung einer C-terminalen Zielsequenz mittels MTG ebenfalls umgebar.

All dies steht jedoch hinter der Feststellung zurück, dass Nanobodies generell bzw. unser S-tag Fusionsprotein als Modellsystem spezifisch mittels MTG fusionierbar sind, ohne dass Funktionsverluste oder unspezifische Beiprodukte auftreten.

6.2.2 Ergebnisdiskussion

6.2.2.1 Expression und Eigenschaften der beiden Konstrukte ^{Ec}anti-hTNF-VHH und ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag

Die Expression der Vektoren pet23a(+)-pelB-anti-hTNF-VHH-myc-his und pet23a(+)-pelB-anti-hTNF-VHH-S-tag-myc-his im *E. coli* Stamm BL21 pLysS und die anschließende Reinigung mittels Ni-NTA Affinitätschromatographie sowie Größenausschlusschromatographie führte zu einem Ertrag an reinem Protein von etwas 10mg/l Bakterienüberstand in beiden Fällen. Dies stellt für unsere Zwecke eine verwendbare Größenordnung dar, die in der zu erwartenden Größenordnung für Expression in *E. coli* liegt (Arbabi Ghahroudi *et al.* 1997; Muyldermans 2001; Cortez-Retamozo *et al.* 2002; Hmila *et al.* 2008). Mit Hefekulturen oder anderen Mikroorganismen können in der pharmazeutischen Herstellung jedoch Expressionsgrößenordnungen bis zu 1g/l erreicht werden (Perez *et al.* 2001; Gibbs 2006).

Bei der Größenausschlusschromatographie zeigte sich sowohl für ^{Ec}anti-hTNF-VHH als auch ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag ein Anteil an Dimeren. Diese scheinen auf nicht-kovalenten Bindungen zu beruhen (keine Dimere auf dem SDS-PAGE Gel) und bei der Expression aufzutreten. Disulfidbrücken sind unwahrscheinlich, da ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag nicht, wie für viele Nanobodies typisch, weitere Cysteine besitzt. Die zwei vorhandenen Cysteine (bei uns Cys 25 und Cys 104) sind die kanonischen Cysteine 22 und 92 (Nummerierung nach (Kabat und Wu 1991)) und für die konservierte Intradomain-Disulfidbrücke zwischen den beiden β -Faltblätter des β -Sandwichs notwendig (Muyldermans 2001; Kolkman und Law 2010). Das Fehlen der Dimere bei erneutem Auftragen der monomeren Fraktionen zeigt, dass

sich nicht ständig - im Sinne eines Gleichgewichts - ein Teil des monomeren Proteins reversibel zu Dimeren zusammenlagert.

Die resultierenden Proteine ^{Ec}anti-hTNF-VHH und ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag liefen sowohl bei der SDS-PAGE als auch bei der Größenausschlusschromatographie bei etwas größeren Proteingrößen. Für ^{Ec}anti-hTNF-VHH ließ sich in der MALDI-TOF Massenspektrometrie die korrekte Größe jedoch eindeutig nachweisen, so dass es sich hierbei um Laufphänomene auf der Säule handeln sollte.

Eine solche verzögerte Elution bei der Größenausschlusschromatographie kann durch eine mögliche unspezifische Interaktion mit der Gel-Matrix verursacht sein. Dies wurde für humane VH und humanisierte Nanobodies (also Kamel-VHH) beschrieben (Vincke *et al.* 2009). Auch wenn unser *Nanobody* ein Wildtypexemplar aus dem Kamel ist (Silence *et al.* 2007) und in den dafür entscheidenden Positionen (F37, E44, R45, F52 – sonst meist G) keine humanen Aminosäuren trägt, besitzt er jedoch eine Reihe eher humantypischer Aminosäuren (L11, P14, A23, V89). Auch wenn für diese Loci (Nummerierung nach (Kabat und Wu 1991)) im von Vincke *et al.* beschriebenen humanisierten *Nanobody* keine Löslichkeitsveränderungen oder Aggregations- bzw. Zusammenlagerungsneigung berichtet wird, können diese jedoch prinzipiell auftreten (Vincke *et al.* 2009). Deshalb ist es umso wichtiger, dass sich unser *Nanobody* stabil als Monomer verhält und wir die Zusammenlagerung zu Dimeren mittels Größenausschlusschromatographie ausschließen konnten.

In vergleichenden Untersuchungen (ELISA und L929-Zytotoxizitätsassay) zeigten die beiden Fusionsproteine ^{Ec}anti-hTNF-VHH und ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag eine ähnliche hTNF-Bindungs- und Neutralisierungsaktivität. (hTNF bindet nur den murinen TNFR1 (Lewis *et al.* 1991), der bei murinen L929-Zellen für TNF-ausgelöste Apoptose verantwortlich ist (Ameloot und Brouckaert 2004).) Das C-terminale Anfügen des *S-tags* führte zu keiner Veränderung der Bindungs- bzw. Neutralisierungseigenschaften.

Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass ein Trimer hTNF bevorzugt jeweils von einem ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag gebunden wird. Zugabe von ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag zu hTNF (Monomer) im molaren Verhältnis von 1 : 3 führt in der Größenausschlusschromatographie zu einer Verschiebung des gesamten hTNF Gipfels zu einem höhermolekularen Komplex, für den sich in der SDS-PAGE zeigt ein eindeutiges 3 : 1 Verhältnis von hTNF zu ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag zeigt. Bände ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag an hTNF Monomere bzw. zerstörte es die

hTNF Trimere, müssten 2/3 des hTNF frei laufen. Darüber hinaus scheint die Bindung des ersten Nanobodies an das hTNF-Trimer deutlich bevorzugt stattzufinden – z.B. durch Behinderung der Bindung weiterer Nanobodies, da ansonsten ebenfalls ein deutlicher hTNF Überschuss bestehen und der hTNF-Gipfel nach wie vor vorhanden sein müsste. Der kleine tatsächlich noch vorhandene hTNF Gipfel beruht auf einem hTNF Überschuss aufgrund der Tatsache, dass nicht exakt 1 : 3 sondern 1 : 3,7 ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag zu hTNF gemischt wurden. Wie sich das Bindungsverhalten bei einem Überschuss an *Nanobody* ändern würde, haben wir nicht untersucht.

Darüber hinaus konnten wir eindeutig zeigen, dass ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag und das TNFR II – Fc Rezeptorkonstrukt Etanercept (Enbrel[®]) um die hTNF Bindung konkurrieren. Demzufolge übt ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag seine hTNF neutralisierende Wirkung durch Verhinderung der Bindung des hTNF Trimers an seine Rezeptoren aus. Zumindest für den TNFR II konnten wir dies hier belegen. Dass Nanobodies generell oft antagonistische Aktivität besitzen, ist an sich nicht überraschend, da die Liganden-Rezeptor Bindung des hTNF-Trimers an seine Rezeptoren in den Furchen zwischen den einzelnen Protomeren stattfindet (Smith *et al.* 1994) und Nanobodies im Gegensatz zu konventionellen Antikörpern aufgrund ihres konvexen und kompakten Paratops bevorzugt in Proteinspalten binden (Kolkman und Law 2010). Allerdings wurde der verwendete *Nanobody* zusätzlich aus einer Phage-Display mit Elutionsschritt durch einen Überschuss an Rezeptor gewonnen (Silence *et al.* 2007), um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass die Nanobodies auch tatsächlich antagonistische Aktivität besitzen. Dass diese Strategie von Erfolg gekrönt war und die Bindung des Nanobodies mit der Rezeptorbindung interferiert, konnten wir hiermit eindeutig nachweisen.

6.2.2.2 Dimerisierung von ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag mittels MTG

Die Dimerisierung von ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag mittels Mikrobieller Transglutaminase zeigte sich als einfach durchzuführende Methode mit einem guten Ertrag an dimerem rekombinanten Protein. Die MTG besitzt ein hohes Aktivitätslevel über einen weiten Temperaturbereich (Zhu und Tramper 2008) und verknüpft ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag sowohl bei 4°C, RT als auch bei 37°C, wobei sie bei 4°C die höchste Aktivität zeigte. Die auf den ersten Moment überraschend erscheinende Aktivität bei 4°C war insbesondere bei der spezifischen Verknüpfung von Fusionsproteinen vorbeschrieben (Kamiya *et al.* 2003b; Takazawa *et al.* 2004; Tanaka *et al.* 2004). Es entstanden nicht nur Dimere, sondern auch Tetramere,

Hexamere und noch höhervalente Komplexe – allerdings keine Trimere oder Pentamere. Darüber hinaus bleibt stets ein Teil der Monomere unverknüpft. Ähnliche Phänomene wurden bereits bei der Verknüpfung von *S-tag* Fusionsproteinen mit MTG beschrieben (Kamiya *et al.* 2003b).

Die wahrscheinliche Erklärung für die Bildung von Multimeren ist die Verknüpfung von mehreren *S-tags* aneinander. Transglutaminasen verknüpfen Glutaminseitenketten bevorzugt mit Lysinseitenketten. Das *S-tag* besitzt ein Glutamin sowie zwei Lysine, die von der MTG erkannt werden (Kamiya *et al.* 2003b) (*S-tag* Sequenz: MKETAAAKFERQHMDSGS – K180, K186, Q190). Damit gibt es zwei verschiedene Möglichkeiten der Isopeptidbindung: K180-Q190 und K186-Q190. Bei einem bereits verknüpften Dimer sind damit jedoch noch je ein Glutamin und drei Lysine frei. Nun wäre es denkbar, dass die MTG das verbleibende Glutamin mit einem der beiden freien Lysine des Dimerpartners verknüpft. Genauso könnte sie die freien Zielgruppen aber mit einem weiteren *S-tag* verknüpfen. Theoretisch wäre so die Bildung einer unbegrenzten Proteinkette denkbar.

Bereits Kamiya *et al.* beobachteten bei Verknüpfung von *S-tag*-EGFP die Bildung von höhermolekularen Komplexen, ohne das EGFP ohne *S-tag* MTG-Substrat wäre. Allerdings handelte es sich in diesem Fall nur um Tetramere und keine multimeren Komplexe noch höherer Ordnung. Die Entfernung des weniger verwendeten Lysins aus dem *S-tag* (entspräche hier K180) führte bei Verknüpfung von *S-tag*-EGFP (enhanced green fluorescent protein) zu einer verzögerten und verringerten aber nach wie vor stattfindenden Tetramerbildung (Kamiya *et al.* 2003b). Dies unterstreicht die Bedeutung der freien Reaktionspartner im *S-tag* zur Bildung von Komplexen höherer Ordnung. Diese zeigt sich darüber hinaus in zwei weiteren Beispielen: bei zwei unterschiedlichen jeweils nur ein Lysin oder ein Glutamin enthaltenden *tags* werden nur Dimere gebildet (Kamiya *et al.* 2003a; Tanaka *et al.* 2004) und im Falle eines *tags* mit zwei Lysinen neben Dimeren entstehen in geringem Maße Komplexe im Verhältnis 2 : 1, aber keine Multimere (Takazawa *et al.* 2004). In beiden Fällen war die Reaktivität der Proteine ohne spezifischen *tag* ausgeschlossen worden. Unklar bleibt, weshalb wir trotz nahezu identischer Reaktionsbedingungen (wir: 2,5 µM Substrat, Kamiya *et al.*: 1,2 µM Substrat - ansonsten identisch) nicht nur Tetramere (Kamiya *et al.* 2003b) sondern auch deutliche Mengen größerer Multimere beobachten (siehe Abb. 5-7 Temp = 4°C, Zeit = 2h, 0,25U/ml MTG – S. 47).

Darüber hinaus beobachten auch Kamiya *et al.* die nur schwer zu erklärende alleinige Bildung von grad-zahligen Komplexen (z.B. keine Trimere). Als Erklärung für die geringe Reaktivität von Monomeren mit Dimeren halten sie sterische Behinderung für unwahrscheinlich und postulieren eine mögliche inhärente Neigung der MTG zur Verknüpfung polymerer Substrate (Kamiya *et al.* 2003b).

Die zweite überraschende Beobachtung ist, dass stets ein Teil der Monomere unverknüpft bleibt. Dies ist nicht durch fehlende Reaktionszeit begründbar, wie sich eindeutig an den nicht vorhandenen Unterschieden der übrig gebliebenen Monomerkonzentrationen in Abb. 5-7 (30h Zeitpunkt bei 4°C) zeigt. Die Verhältnisse von Monomer zu Dimer zu Multimeren sind trotz mehr als 10-fachen Enzymkonzentrationsunterschieden gleich. Die Reaktion ist fertig abgelaufen und die Monomere sind nicht mehr verknüpfbar, wie sich bei erneuter Inkubation mit MTG zeigt (Daten nicht gezeigt). Kamiya *et al.* beobachten dieses Phänomen ebenfalls und bieten zwei mögliche Erklärungen an:

1. Eine kompetitive hydrolytische Deamidierung von Glutamin zu Glutamat.
2. Eine Intraproteinverknüpfung des S-tags mit dem Protein selbst (Kamiya *et al.* 2003b).

1. Eine kompetitive hydrolytische Deamidierung von Glutamin zu Glutamat: diese findet statt, wenn kein primäres Amin zur Verfügung steht (Buchert *et al.* 2010), und wird dementsprechend mit einer geringen Substratkonzentration in Zusammenhang gebracht (Kamiya *et al.* 2003a; Tanaka *et al.* 2004). Bei getrennten Glutamin(Q)- und Lysin(K)-tags führt MTG Einwirkung nur beim Q-tag Fusionsprotein zu einer Veränderung des Laufverhaltens (Kamiya *et al.* 2003a; Takazawa *et al.* 2004; Tanaka *et al.* 2004). Zudem führt gezieltes Einfügen eines Glutamats in einen Q-tag zu einer Verringerung der Mobilität im Polyacrylamidgel gleichen Ausmaßes, wie die des Q-tag Fusionsproteins nach MTG Einwirkung (Tanaka *et al.* 2004). Auch wenn die Erklärung von Tanaka *et al.* bezüglich einer Ladungsveränderung als Grund für die Verschiebung nach oben hinkt (Hausmann *et al.* 1986; Manning und Colon 2004), erscheint dementsprechend eine kompetitive Deamidierung von Glutamin zu Glutamat als die wahrscheinliche Erklärung für die nicht reagiblen Monomere. Bei uns ist nur eine sehr geringe Veränderung des Laufverhaltens des nicht reagierten Monomers allerdings in gleicher Richtung zu beobachten. Überraschend bleibt die fehlende relative Abnahme von nicht reagiertem Monomer zu Dimeren und Multimeren auch bei einer 10-fachen Steigerung der Nanobodykonzentration (Tanaka *et al.* 2004).

2. Eine Intraproteinverknüpfung des *S-tags* mit dem Protein selbst: aufgrund der weitreichenden Aussage bezüglich der Spezifität der MTG zur Modifizierung von Nanobodies wird diese Möglichkeit hier ausführlich diskutiert. Die Mikrobielle Transglutaminase hat verglichen mit Säugetier-Transglutaminasen ein weiteres Substratspektrum besonders bezüglich des primären Amins (Acyl-Akzeptor – meist Lysin) und man ist weit davon entfernt, ihre Spezifität exakt zu kennen (Kamiya *et al.* 2003b; Sugimura *et al.* 2008; Tagami *et al.* 2009). Auf jeden Fall verknüpft sie bevorzugt flexible Proteinanteile und kann vor allem mit starren globulären Strukturen eher schlecht umgehen (Kamiya *et al.* 2003a; Fontana *et al.* 2008; Tagami *et al.* 2009; Buchert *et al.* 2010). Für die eigentlich deutlich spezifischere Meerschweinchen-Transglutaminase (besonders bezüglich des Acyl-Akzeptors) (Kamiya *et al.* 2003b) wurde jedoch eine solche Intraproteinverknüpfung in einem GFP-Fusionprotein berichtet (Furutani *et al.* 2001).

Interessanterweise ist die posttranslationale Verknüpfung von anderen Antikörperfragmenten (scFv) durch MTG mittels eines *Q-tags* spezifisch bezüglich der angehängten Zielpeptidsequenz (Kamiya *et al.* 2003a; Takazawa *et al.* 2004). Bei der Verknüpfung unseres Nanobodies ohne *S-tag* (anti-hTNF-VHH) lassen sich jedoch eindeutig unspezifische Verknüpfungen nachweisen, wenn auch in so geringem Umfang, dass sie ohne Konzentrierungsschritt nicht aufgefallen wären. Dies wirft natürlich auch Fragen bezüglich der berichteten „absoluten“ Spezifität bei der scFv Verknüpfung auf (Kamiya *et al.* 2003a; Takazawa *et al.* 2004). Allerdings unterscheiden sich scFv und Nanobodies durch das Fehlen der variablen Domäne der Leichtkette, wodurch die Region des *framework 2* (FR2), die sonst für die Interaktion der beiden Domänen zuständig ist, freigelegt ist (Kolkman und Law 2010). Bei einem Alignment einer vorgeschlagenen Art von Konsensussequenz der MTG für den Acyl-Donor Glutamin von Sugimura *et al.* (-3: W/F/Y -1:L 0=Q +1: R +2: Prolin + Y C-terminal) (W = Tryptophan, F = Phenylalanin, Y = Tyrosin, L = Leuzin, Q = Glutamin, R = Arginin, P = Prolin) (Sugimura *et al.* 2008) mit unserer *Nanobody*-Sequenz ergab sich eine mögliche MTG-Verknüpfungsstelle im FR2 (*FR2 = kursiv*) (*IGWFRQAPGKEREFVA* dargestellte Aminosäuren: 42-57) (European-Bioinformatics-Institute 2012). Auch wenn hier eine möglicherweise entscheidende hydrophobe Aminosäure (z.B. Leuzin s.o.) N-terminal vor dem Glutamin fehlt (Kamiya *et al.* 2009), und das Arginin an Position 1 relativ zum Glutamin ebenfalls nicht vorhanden ist, so befinden sich mit dem Phenylalanin (-2) und dem Alanin (+1) durchaus weitere typische Aminosäuren in passender Position (Sugimura *et al.* 2008).

Aufgrund der Nähe zu den exponierten Kamel-typischen löslichkeitsverbessernden Aminosäuren im FR2 Phe 45, Glutamat 52, Arg 53 und Phe 55 (Nummerierung nach Kabat *et al.*: F37, E44 R45, F47) (Kabat und Wu 1991; Vincke *et al.* 2009; Kolkman und Law 2010) wäre diese Region wahrscheinlich gut zugänglich. Unklar bleibt inwieweit diese Region flexibel genug ist (z.T. β -Faltblatt) (Desmyter *et al.* 2001; Perez *et al.* 2001; Emberly *et al.* 2004), damit die MTG die möglicherweise passende für Nanobodies typische Aminosäuresequenz (Riechmann und Muyldermans 1999; Silence *et al.* 2007; Vincke *et al.* 2009) als Substrat verwenden kann (Fontana *et al.* 2008; Mero *et al.* 2009; Tagami *et al.* 2009). Zumal Proteasen ebenfalls flexible Regionen – oft sogar die selben – bevorzugen (Fontana *et al.* 2008; Tagami *et al.* 2009) und Nanobodies relativ Proteasen-stabil sind (Muyldermans 2001; Harmsen *et al.* 2006).

Die Tatsache der - wenn auch äußerst geringen - Verknüpfung von ^{Ec}anti-hTNF-VHH beweist, dass auf der Oberfläche unseres Nanobodies für die MTG erreichbare Substratseitenketten vorhanden sind. Die Verknüpfung des hochflexiblen *S-tags* mit der globulären Antikörperdomäne könnte möglicherweise deutlich effizienter stattfinden. Das Hauptargument gegen eine Intraproteinverknüpfung z.B. des *S-tags* mit dem erwähnten Q47 (nach Kabat: Q39) ist allerdings die Tatsache, dass Proteine mit einer solchen üblicherweise eine erhöhte Mobilität auf der SDS-PAGE zeigen (Hausmann *et al.* 1986; Furutani *et al.* 2001; Walker und Rapley 2008; Bokiej *et al.* 2011). Die Veränderung muss nicht sehr ausgeprägt sein, gerade wenn nur eine einzelne und terminal gelegene vorhanden ist (Hausmann *et al.* 1986). Sie kann aber auch in einem solchen Fall deutlich sichtbar sein (Bokiej *et al.* 2011), wie auch die Intraproteinverknüpfung eines GFP Proteins durch Meerschweinchen-Transglutaminase zeigte (Furutani *et al.* 2001). Bei uns lässt sich jedoch wenn überhaupt nur ein diskreter Shift des nicht reagierten Monomers nach oben nachweisen. Zusammenfassend ist aller Wahrscheinlichkeit nach die kompetitive Deamidierung des Glutamins für die nicht reagiblen Monomere verantwortlich. Die unspezifische Verknüpfung von Nanobodies kommt nur zu einem äußerst geringen Anteil vor und spielt in diesem Zusammenhang vermutlich keine Rolle.

Die Tatsache der Multimerbildung führte ursprünglich - unter Annahme von räumlicher Verfügbarkeit des Substrats als entscheidendem Faktor - zur Befürchtung einer Verschiebung der Produkte in Richtung höhervalenter Komplexe bei Steigerung der Substratkonzentration. Diese Befürchtung stellte sich allerdings als unbegründet heraus.

Mittels Größenausschlusschromatographie ließen sich multimeres, dimeres und monomeres ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag gut von einander trennen. Auch die Dimere (~ 42 kDa) verhalten sich mit einem 65 – 70 kDa entsprechenden Elutionsvolumen wie größere Proteine. Dies entspricht jedoch relativ exakt dem Doppelten des Monomers (20,9 kDa), welches mit einem 34,8 kDa entsprechenden Elutionsvolumen bereits ebenso bei zu großen Proteingrößen eluierte.

6.2.2.3 Eigenschaften dimeren (und multimeren) ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tags

Es wurde bei vergleichenden Untersuchungen kein monomeres ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag aus MTG-Reaktionen verwendet, um keine Interferenzen durch eine nicht vollkommen auszuschließende die Affinität verändernde Einwirkung der MTG zu bekommen. Vergleichende Untersuchungen zwischen monomerem ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag vor und nach MTG Inkubation wurden nicht durchgeführt, wären aber natürlich interessant, um eindeutig zu zeigen, dass die MTG keinen negativen Einfluss auf die antigenbindende Region hat.

Im ELISA zeigten sowohl dimeres als auch multimeres ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag hTNF Bindungsaktivität. Im Vergleich zu monomerem ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag fällt die Nachweisreaktion über den „c-myc tag“ jedoch deutlich geringer aus. Unter Berücksichtigung der höheren hTNF neutralisierenden Aktivität im L929 Zytotoxizitätsassay allerdings liegt dies höchst wahrscheinlich nicht an verminderter Bindungsaktivität des dimeren Proteins. Eine plausible Erklärung erscheint eine mögliche verminderte Bindung des primären anti-c-myc Nachweisantikörpers aufgrund sterischer Behinderungen. Unabhängig davon ist nicht vollkommen auszuschließen, dass die Affinität der einzelnen Bindungsstellen doch abgenommen hat, aber überkompensierende Aviditätseffekte an dem immobilisierten hTNF nicht zur Wirkung kommen können (Pluckthun und Pack 1997). (Im ELISA muss sich so z.B. eine erhöhte Affinität nicht unbedingt (Conrath *et al.* 2001) oder z.B. eine erhöhte Neutralisierungsaktivität nicht eins zu eins (Ibanez *et al.* 2011) widerspiegeln.) Dies hängt von einer Reihe von Faktoren wie z.B. Antigendichte und Erreichbarkeit ab (Pluckthun und Pack 1997). Ein möglicher Nachweis der Hypothese der verminderten Bindung des primären Nachweisantikörpers wäre z.B. ein vergleichender Westernblot mit gleichen (Massen-)Mengen an Monomeren und Dimeren nach Trennung mittels SDS-PAGE oder idealerweise nativer Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

Im L929 Zytotoxizitätsassay zeigt dimeres ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag im Vergleich zu monomerem eine deutlich erhöhte hTNF neutralisierende Aktivität. Diese beruht vermutlich

auf Aviditätseffekten durch die Bivalenz des *Nanobody* Dimers (Pluckthun und Pack 1997). Zum besseren Vergleich der Dimere mit den Monomeren stellen wir aufgrund der Bivalenz der Dimere nicht einfach molare Proteinkonzentrationen einander gegenüber sondern die Konzentration an Bindungsstellen.

	^{Ec} anti-hTNF-VHH	^{Ec} anti-hTNF-VHH-S-tag	Monomer (Direktvergleich h)	Dimer
IC ₅₀	8,3 nM	9,3 nM	11,2 nM	0,95 nM
VHH : hTNF	4,3 : 1	4,8 : 1	5,8 : 1	0,5 : 1
Bindungsstellen	4,3 : 1	4,8 : 1	5,8 : 1	1 : 1
rel. Steigerung				ca. 5x

Tab. 6-2 Vergleich der hTNF Neutralisierungsaffinität im L929 Zytotoxizitätsassay

Bedingungen: [hTNF Trimer] = 1,93 nM ([Monomer] = 5,8nM) ohne Actinomycin D oder Cycloheximid, Inkubation des *Nanobody* hTNF Gemisches für 30 min bei 37°C, Zelldichte von 10.000 pro well, 24h Wachstumszeit und 24h Inkubationszeit mit hTNF/*Nanobody*.

Das Dimer ist mit einer IC₅₀ (inhibiting concentration 50%) von 0,95 nM (Bindungsstellen 1,9nM) ca. 5-fach so aktiv wie das Monomer (IC₅₀=11,2 nM). Für eine halbmaximale Inhibierung der Zytotoxizität genügen Monomere im Verhältnis zu hTNF-Trimeren von 5 : 1 und Dimerbindungsstellen zu hTNF-Trimer von 1 : 1. Damit überhaupt die Hälfte der Zellen überleben können, darf die freie hTNF Konzentration nicht über 1 ng/ml liegen (vgl. Zytotoxizitätskurve Abb. 5-12 – S. 53f), was einem Anteil von freiem hTNF von 1% entspräche. Damit zeigt das Dimer eine hTNF neutralisierende Aktivität am oberen Limit unter den gewählten Bedingungen im L929 Zytotoxizitätsassay (siehe Tab. 6-2). Mehr als ein Antigen pro Antigenbindungsstelle kann nicht neutralisiert werden.

Die Tatsache, dass in der Literatur Neutralisierungsaktivitätssteigerungen durch Dimerisierung im Bereich bis zu 400-fach (Coppieters *et al.* 2006; Silence *et al.* 2007) oder noch höher (Ibanez *et al.* 2011) liegen, beruht nicht auf einer höheren Aktivität des Dimers, sondern auf der Tatsache, dass mehr Monomer zum Erreichen eines halbmaximalen Effektes benötigt wurde (Verhältnisse von 70 : 1 (Coppieters *et al.* 2006) bis zu 500 oder > 1000 : 1 (Silence *et al.* 2007). Unser *Nanobody* ^{Ec}anti-hTNF-VHH bzw. ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag wurde im Patent US20070077249A1 (VHH#3E) mithilfe eines Protein-*linkers* dimerisiert. Die beschriebene 400-fache Steigerung der Neutralisierungsaktivität liegt deshalb nicht an geringer Aktivität des Monomers sondern an den Bedingungen in den vergleichenden Tests (Silence *et al.* 2007). Dementsprechend wären sensitivere Testbedingungen ebenfalls für

unser mittels MTG dimerisiertem ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag Dimer interessant, um eine Unterschätzung der Aktivitätssteigerung (Coppieters *et al.* 2006) zu vermeiden. Darüber hinaus wäre eine direkte Messung der Affinitätssteigerung z.B. mittels Surface Plasmon Resonance aufschlussreich, auch wenn eine solche Affinitätssteigerung nicht immer mit einer Steigerung der eigentlichen Zielgröße Neutralisierungsaktivität einhergehen muss (Hmila *et al.* 2008).

Da die Aktivitätssteigerung des Dimers auf Aviditätseffekten beruhen soll, überrascht die Tatsache etwas, dass das Dimer in der Lage sein soll, pro Bindungsstelle ein hTNF-Trimer zu neutralisieren. Im Patent US20070077249A1 wurde für tetrameres mittels Protein-*linker* verknüpftem VHH#3E (entspricht unserem verwendeten *Nanobody*) ebenfalls ein Erreichen des oberen Aktivitätslimits beschrieben ($IC_{50}=6pM$ bei 25pM hTNF-Trimer → Bindungsstellen : hTNF-Trimer = 1 : 1). Für Aviditätseffekte müssen zwei Bindungsstellen desselben Antikörpers an ein und dasselbe Antigen binden. Bei einem Verhältnis von Bindungsstellen zu trimerem hTNF-Antigen von 1 : 1 wären Aviditätseffekte nicht mehr möglich.

Die Aktivitätsunterschiede im L929-Zytotoxizitätsmodell konnten auch auf Proteinebene der Apoptoseauslösung sowie morphologisch gezeigt werden. Ebenso zeigen die Dimere im HEK293-Stimulationsassay eine gesteigerte hTNF neutralisierende Aktivität.

Die als Nebenprodukt entstandenen Multimere zeigen ebenfalls eine gesteigerte, dem Dimer vergleichbare, hTNF neutralisierende Aktivität. Eine mögliche weitere Aktivitätssteigerung höhervalenter Moleküle gegenüber Dimeren, wie anderswo beschrieben (Silence *et al.* 2007; Kolkman und Law 2010), ist - wie oben erläutert - unter unseren Testbedingungen im L929 Zytotoxizitätsassay nicht darzustellen.

In einem Tiermodell der Sepsis mittels intraperitonealer LPS und D-Galaktosamin Applikation konnten wir zeigen, dass sowohl das ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag Monomer als auch das Dimer in der Lage sind, den Tod in transgenen hTNF exprimierenden Mäusen zu verhindern. Den *in vitro* festgestellten Unterschied in der hTNF neutralisierenden Aktivität konnten wir bei der verwendeten Dosis von je 300 µg nicht zeigen. Zur differenziellen Darstellung der Aktivitätsunterschiede müssten weitere Mausexperimente mit verschiedenen Dosierungen folgen.

Zusammenfassend konnten wir auf verschiedene Weisen zeigen, dass die posttranslationale Verknüpfung von Nanobodies mittels Mikrobieller Transglutaminase zu dimeren hTNF

neutralisierenden Konstrukten führt, deren Aktivität gegenüber Monomeren deutlich gesteigert ist. Auch wenn Verknüpfung auch außerhalb des S-tags möglich zu sein scheinen, spielen diese aller Wahrscheinlichkeit nach keine Rolle.

6.2.3 Beantwortung der ersten Fragestellung

Nanobodies haben das Potential, einen Teil zur Lösung der möglichen Unbezahlbarkeit zukünftiger Antikörpertherapien (Dübel 2007; Drucker *et al.* 2008) beizutragen (Kolkman und Law 2010). Eine posttranslationale Modifizierung oder Verknüpfung mit Proteinen und nicht proteinartigen Anteilen erweitert die Einsatzmöglichkeiten der bereits sehr vielseitig einsetzbaren Nanobodies weiter (Harmsen *et al.* 2007; Fontana *et al.* 2008; Huang *et al.* 2008; Kamiya *et al.* 2009; Abe *et al.* 2010). Die Mikrobielle Transglutaminase bietet sich dazu aufgrund ihrer günstigen Eigenschaften an (Kamiya *et al.* 2003b; Zhu und Tramper 2008; Abe *et al.* 2010), zumal sie zurzeit das einzige im kommerziellen Maßstab in Lebensmittelqualität erhältliche Protein-quervernetzende Enzym darstellt (Buchert *et al.* 2010). Durch die spezifische Verknüpfung unseres Nanobodies ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag mittels MTG wurden Dimere und Multimere mit verbesserten hTNF Neutralisierungseigenschaften erzeugt. Auf diese Weise konnten wir im Modellsystem der Dimerisierung zeigen, dass sich die Mikrobielle Transglutaminase prinzipiell zur spezifischen Modifizierung von Nanobodies mit Zielpeptidsequenz eignet ohne negative Auswirkungen auf die Affinität zu haben.

6.2.4 Ausblick

Zur genaueren vergleichenden Untersuchung der Aktivität der Dimere wären weitere und vor allem sensitivere Untersuchungsbedingungen bezüglich der Aktivitätsunterschiede hilfreich. Darüber hinaus wäre es auch wünschenswert mithilfe einer Titrierungsreihe die Aktivitätsunterschiede ebenfalls *in vivo* darzustellen. Insbesondere wäre auch eine Messung der Affinität mittels Surface Plasmon Resonanz interessant. Zum einen bei nicht reagierten Monomeren nach MTG Einwirkung, um negative Effekte auszuschließen, zum anderen bei Dimeren um deren Affinität zu bestimmen.

Bis zu einer Verwendung von MTG zur posttranslationalen Modifizierung von Nanobodies im großen Maßstab müssten ein Reihe weiterer Untersuchungen zur Spezifität der Mikrobiellen Transglutaminase bei Nanobodies folgen. Dies könnte z.B. mit weiteren Nanobodies oder anderen Zielpeptiden geschehen. Zur Verhinderung der Bildung von Multimeren sowie zur Bildung von Heterodimeren wäre die Verwendung von

unidirektionalen *tags* (jeweils nur ein Q oder ein K) hilfreich. Zugleich müssten die Reaktionsbedingungen optimiert werden zur Verminderung von nicht-reagiertem Monomerausschuss (z.B. mittels K-*tag* Überschuss). Dies würde den Ertrag an erwünschten Zielkonstrukten deutlich erhöhen. Auch die Untersuchung eines Q47 (nach Kabat: Q39) defizienten Nanobodies (mit oder ohne S-*tag*) wäre aufschlussreich. Darüber hinaus ständen Schritte zur Verknüpfung von Nanobodies mit Nicht-Protein Anteilen an. Denn prinzipiell stellt die MTG aus vielen Gründen eine interessante Möglichkeit zur Modifizierung von Nanobodies dar.

6.3 Expression eines aktiven *Nanobody*-ELP (*elastin-like polypeptide*) Fusionsproteins (^{Nt}anti-hTNF-VHH-100xELP) in *Nicotiana tabacum*

6.3.1 Hintergründe

Einer der zentralen Punkte in der Weiterentwicklung der Antikörpertherapien ist neben neuen und verbesserten Anwendungen eine Kostensenkung. Nanobodies sind dabei ein wichtiger Schritt, unter anderem da sie in Mikroorganismen hergestellt werden können (Arbabi Ghahroudi *et al.* 1997; Muyldermans 2001; Coppieters *et al.* 2006). Ein weiterführender Schritt ist die Verwendung von Pflanzen als kostengünstiges Expressionssystem (Ma *et al.* 2003). Schätzungen zufolge können Proteine in Pflanzen noch einmal 50 bis 90% günstiger als in *E. coli* hergestellt werden (Scheller *et al.* 2001; Scheller *et al.* 2004).

Allerdings beschränken oft eine ungenügende Anreicherung des rekombinanten Proteins sowie wenig effiziente Reinigungsmethoden die Verwendung von pflanzlichen Expressionssystemen für die Produktion in großem Maßstab (Conley *et al.* 2011). *Nanobody*-ELP (*elastin-like polypeptide*) Fusionsproteine überwinden beide Limitierungen: durch Steigerung der Expression sowie durch eine extrem einfache Reinigungsmethode (Floss *et al.* 2010; Conley *et al.* 2011). *Nanobody*-ELP Fusionsproteine aus Pflanzen haben somit das Potential einer bisher unerreichten Ökonomisierung von Antikörpertherapien - von der Herstellung über die Reinigung bis hin zur Lagerung.

Das *elastin-like polypeptide* ermöglicht mittels *inverse transition cycling* (ITC) eine äußerst simple Reinigungsmethode durch reversibles Ausfällen mittels Erhöhung von Temperatur sowie Salzkonzentration (Meyer und Chilkoti 1999; Floss *et al.* 2010). Darüber hinaus steigert es durch Lagerung in Speichervakuolen („protein-bodies“) den Ertrag seines Fusionspartners deutlich (Conley *et al.* 2011). Es wurden bereits eine Reihe von ELP-

Fusionproteinen hergestellt. Für die allermeisten konnte gezeigt werden, dass ihre Aktivität erhalten bleibt (Floss *et al.* 2010; Conley *et al.* 2011)

Um zu zeigen, dass Nanobodies ebenfalls als aktives ELP-Fusionsprotein exprimiert werden können, haben wir anti-hTNF-VHH-100xELP zunächst wie unsere anderen Konstrukte in *E. coli* hergestellt (^{Ec}anti-hTNF-VHH-100xELP). Anschließend haben wir gezeigt, dass das rekombinante Protein in Tabakpflanzen gut exprimierbar ist, mittels ITC aufreinigbar ist und haben allererste Aktivitätstest durchgeführt (^{Nt}anti-hTNF-VHH-100xELP).

6.3.2 Diskussion der Ergebnisse

6.3.2.1 Expression von anti-hTNF-VHH-100xELP in *E. coli* (^{Ec}anti-hTNF-VHH-100xELP)

Um sterische Behinderungen des Nanobodies (17 kDa) durch den großen ELP-Schwanz (42 kDa), welche die Aktivität des Konstruktes signifikant einschränken könnten, auszuschließen, wurde ^{Ec}anti-hTNF-VHH-100xELP zunächst in *E. coli* exprimiert. Ein solche Einschränkung der Aktivität wurde für einige wenige ELP-Fusionsproteine beschrieben, darunter auch deutlich größere Fusionspartner (Floss *et al.* 2010; Conley *et al.* 2011). Allerdings war sie für ein *Nanobody*-ELP Fusionskonstrukt nicht unbedingt zu erwarten war, da auch scFv-ELPs keinerlei Einschränkungen zeigten (Scheller *et al.* 2006; Joensuu *et al.* 2009; Floss *et al.* 2010).

Aufgrund eines fehlenden proteintypischen Spektrogramms im UV-Spektrum konnte die ^{Ec}anti-hTNF-VHH-100xELP Konzentration nur geschätzt werden. Die Ausbeute an ^{Ec}anti-hTNF-VHH-100xELP bei erster, nicht optimierter Reinigung war mit geschätzten 120 µg/l Vergleich zu ^{Ec}anti-hTNF-VHH und ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag deutlich geringer. (Bei selbem Vorgehen 8,4mg ^{Ec}anti-hTNF-VHH bzw. 4,6mg und ^{Ec}anti-hTNF-VHH-S-tag.) Die Gründe dafür lagen, neben dem deutlich geringeren Expressionslevel des ELP-Fusionsproteins, in deutlichen Proteinverlusten bei der anfänglich noch durchgeführten Umpufferung. Allerdings muss die Expression von ELP-Fusionsproteinen in *E. coli*, wie bereits mehrfach gezeigt, nicht mit geringen Ausbeuten verbunden sein (Shimazu *et al.* 2003; Floss *et al.* 2010).

^{Ec}anti-hTNF-VHH-100xELP zeigt im ELISA antigenbindene Aktivität in derselben Größenordnung der anderen beiden rekombinanten Proteine. ^{Ec}anti-hTNF-VHH-100xELP besitzt aufgrund der klonierungstechnischen Vorgehensweise zwei „c-myc tags“. Dies spiegelt sich aus Gründen, über die sich nur spekulieren lässt (z.B. sterische Erreichbarkeit)

(Pluckthun und Pack 1997), im ELISA nicht wieder. Aufgrund der exponentiellen Konzentrationsschritte (jeweils das 10-fache) spielt eine mögliche stärkere Nachweisbarkeit des Faktors 2 darüber hinaus keine relevante Rolle. Auf jeden Fall konnte in diesem vorläufigen ELISA gezeigt werden, dass ^{Ec}anti-hTNF-VHH-100xELP hTNF-Bindungsaktivität besitzt.

6.3.2.2 Expression von anti-hTNF-VHH-100xELP in Tabakpflanzen (^{Nt}anti-hTNF-VHH-100xELP)

Neben der Expression des aktiven ^{Nt}anti-hTNF-VHH-100xELP wurde zum Vergleich der *Nanobody* ohne 100xELP-Proteinschwanz in Tabakpflanzen exprimiert (^{Nt}anti-hTNF-VHH). Zur Expression der beiden Konstrukte wurde ein binärer Vektor (pCB301-Kan) (Xiang *et al.* 1999; Gahrtz und Conrad 2009b) verwendet, bei dem die Ziel-DNA und die Gene für die Integration auf zwei getrennten Plasmiden liegen (Lee und Gelvin 2008). Die Expressionskassetten stehen unter Kontrolle des starken, konstitutiven und ubiquitären cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S Promotor, der u. a. in den Blättern der Tabakpflanze für Expression sorgt (Odell *et al.* 1985; Conrad *et al.* 1998; Ma *et al.* 2003). Das LeB4 Signalpeptid (Baumlein *et al.* 1986) sorgt zusammen mit der abschließenden KDEL Sequenz (Munro und Pelham 1987) für die Translation in das und Retention im Endoplasmatischen Retikulum.

Vortests mit transient transfizierten Tabakblättern zeigten für beide Konstrukte eine vorhandene Expression. Die stabile Transfizierung von Tabakblattscheiben erfolgte mit durch Elektroporierung transformiertem *Agrobacterium tumefaciens* (Horsch *et al.* 1985). Es konnten sowohl für ^{Nt}anti-hTNF-VHH-100xELP als auch für ^{Nt}anti-hTNF-VHH stabil transfizierte Pflanzen hochgezogen werden. In Western Blots der Tabakblätter zeigt sich wie bereits für die meisten anderen ELP-Fusionsproteine vorbeschrieben (Scheller *et al.* 2006; Floss *et al.* 2010; Conley *et al.* 2011) eine deutlich höhere Expression (im Prozentbereich – geschätzt > 2 %) des ^{Nt}anti-hTNF-VHH-100xELP im Vergleich zum ^{Nt}anti-hTNF-VHH.

Die Konzentration der gereinigten Proteine ^{Nt}anti-hTNF-VHH-100xELP und ^{Nt}anti-hTNF-VHH musste wiederum geschätzt werden, da diese, wie schon die *E. coli* Proteine, im UV-Spektrometer kein proteintypisches Spektrogramm zeigten. In ersten semiquantitativen Aktivitätstests im L929 Zytotoxizitätsassay zeigte mittels ITC gereinigtes ^{Nt}anti-hTNF-VHH-100xELP eine deutliche konzentrationsabhängige hTNF neutralisierende Aktivität, die sich

bei aller Unsicherheit bezüglich der Konzentrationsabschätzung vermutlich in einer ähnlichen Größenordnung wie in *E. coli* produziertem ^{Ec}anti-hTNF-VHH bewegt.

Bei ^{Nt}anti-hTNF-VHH wurden aufgrund von schwierigerer Konzentrationsschätzung und geringerem Probenvolumen nur erste qualitative Tests durchgeführt. Das Hinzufügen von ^{Nt}anti-hTNF-VHH enthaltendem Probenvolumen führt bis zur vollständigen Inhibition der Zytotoxizität.

Auch wenn dies nur vorläufige Tests darstellen, konnten wir zeigen, dass die Expression von ^{Nt}anti-hTNF-VHH-100xELP in Tabakpflanzen, gereinigt durch ITC, zu einem aktiven hTNF neutralisierendem Fusionsprotein führt. Auch ^{Nt}anti-hTNF-VHH lässt sich in Tabakpflanzen in aktiver Form exprimieren, wenn auch mit deutlich geringerem Ertrag.

6.3.3 Beantwortung der zweiten Fragestellung

Aufgrund der herausragenden Skalierbarkeit sind Pflanzenexpressionssysteme in der Herstellung rekombinanter Proteine ein wichtiger Zukunftszweig, um die Verfügbarkeit und vor allem die Bezahlbarkeit (Dübel 2007; Drucker *et al.* 2008) neuartiger Medikamente dieser Klasse auch in Zukunft zu sichern (Scheller *et al.* 2001; Ma *et al.* 2003). Dies wird durch die Verfügbarkeit einer einfachen, effizienten und ebenfalls unkompliziert steigerbaren Reinigungsmethode, dem *inverse transition cycling* (ITC), komplettiert (Floss *et al.* 2010; Conley *et al.* 2011). Günstige Eigenschaften wie die der Nanobodies bezüglich einfacher Lagerung und Applikation senken die Kosten dieses Medikamentenzweiges weiter (Kolkman und Law 2010). Darüber hinaus löst die Fusion mit einem 100xELP-Schwanz voraussichtlich auch das Problem der geringen Halbwertszeit der *Nanobodies in vivo* (Coppieters *et al.* 2006; Tijink *et al.* 2008). Deshalb stellt die Expression und Reinigung eines aktiven *Nanobody*-ELP-Fusionsproteins (^{Nt}anti-hTNF-VHH-100xELP) aus Tabakpflanzen in auf den ersten Blick vernünftigen Mengen einen interessanten Erkenntnispunkt in der Produktion günstiger Antikörpertherapien dar.

6.3.4 Ausblick und bereits erfolgte weiterführende Experimente

Als Fortsetzung der vorliegenden Arbeit wurden bereits weitere Untersuchungen zum Expressionsniveau von ^{Nt}anti-hTNF-VHH-100xELP sowie genaue vergleichende Aktivitätstest durchgeführt. Darüber hinaus war ^{Nt}anti-hTNF-VHH-100xELP in der Lage hTNF *in vivo* zu neutralisieren und verhinderte die Sterblichkeit im LPS/D-Gal Sepsismodell der Maus komplett. Gleichzeitig besaß es eine um den Faktor 20 verlängerte Halbwertszeit

(Conrad *et al.* 2011). Somit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass ein *Nanobody* aus Pflanzen *in vivo* aktiv ist und als ELP-Fusionsprotein eine verbesserte Pharmakodynamik besitzt (Conrad *et al.* 2011).

Bis zur klinischen Anwendung von Nanobodies aus Pflanzen oder anderen ELP-Fusionsproteinen generell ist es noch ein weiter Weg. Dazu muss zum einen beispielsweise zunächst einmal gezeigt werden, dass die ELP bedingte Expressionsverstärkung auch außerhalb der kontrollierten Bedingungen eines Gewächshauses funktioniert (Floss *et al.* 2010). Auch sind Methoden zur nachträglichen Entfernung des ELP-Anhangs eine interessante zu untersuchende Möglichkeit (Floss *et al.* 2010).

Aber völlig unabhängig davon werden die Expressionssteigerung durch ELP und effiziente Reinigungsmethoden wie *inverse transition cycling* eine wichtige Rolle in der Herstellung rekombinanter Proteine spielen (Conley *et al.* 2011). Möglicherweise können ELP/ITC-basierte Reinigungsverfahren eines Tages sogar klassische chromatographische Verfahren überflüssig machen (EMAC – ELP-mediated affinity capture) (Floss *et al.* 2010). Auch deswegen ist es wichtig gezeigt zu haben, dass die Reinigung von Nanobodies mittels ITC prinzipiell möglich ist.

7 Zusammenfassung

Single-domain Antikörper oder *Nanobodies* besitzen aufgrund ihrer geringen Größe eine Reihe herausragender Eigenschaften, die sie in die Lage versetzen, Limitationen (z.B. Kosten, Stabilität, versteckte Epitope, Gewebegängigkeit) klassischer IgG-Antikörpertherapien zu überwinden.

Zur Erweiterung ihrer Einsatzmöglichkeiten werden Antikörper häufig modifiziert und z.B. an Radionuklide oder Polyethylenglykol gekoppelt. Als neuartiger Ansatz zur gezielten Modifizierung von *Nanobodies* haben wir die Mikrobielle Transglutaminase (MTG) untersucht. Als Modellsystem der Modifizierung wurde die Dimerisierung mittels Ribonuklease A *S-tag* gewählt und am Beispiel eines *Nanobodies* gegen humanen Tumor Nekrose Faktor (hTNF) eine Methode zur MTG-induzierten Dimerisierung etabliert. Die dimeren *Nanobodies* wiesen gegenüber den monomeren *Nanobodies* eine um den Faktor 5 gesteigerte Aktivität auf.

Auf Pflanzen basierende Expressionssysteme besitzen gegenüber klassischen Verfahren zur Produktion rekombinanter Proteine Vorteile wie Kostenersparnis, Erweiterbarkeit der Anbaufläche und etablierte Anbau- und Ernteverfahren. Die zentralen Einschränkungen wie geringe Proteinakkumulation und ineffiziente Aufreinigungsverfahren können durch Anfügen eines Elastin-ähnlichen Polypeptids (*elastin-like polypeptide*, ELP) überwunden werden. Die Anreicherung der rekombinanten Proteine in Pflanzen wird deutlich gesteigert und gleichzeitig ermöglicht der ELP-Anhang eine simple und effiziente Reinigungsmethode – das *inverse transition cycling* (ITC). Sie beruht auf reversibler Aggregation in Abhängigkeit von Temperatur und Salzkonzentration. Hier zeigen wir, dass das Anfügen eines ELP-Anhangs an den verwendeten *Nanobody* zu einer deutlichen Steigerung der Akkumulation auf über 2% des gesamten löslichen Proteins führt. Aktivitätstests des anhand ITC gereinigten anti-hTNF-*Nanobody*-ELP Fusionsproteins wiesen eine dem aus *E. coli* stammenden *Nanobody* vergleichbare Aktivität auf. In auf dieser Dissertation aufbauenden Experimenten verhinderten die anti-hTNF-*Nanobody*-ELP Fusionsproteine die Sterblichkeit im LPS/D-Gal Sepsis-modell der Maus komplett. Zudem war die Halbwertszeit des anti-hTNF-*Nanobody*-ELP Fusionsproteins gegenüber dem ursprünglichen *Nanobody* um den Faktor 20 verlängert. Die Modifizierung / Dimerisierung von *Nanobodies* mittels Mikrobieller Transglutaminase sowie die Expression und Aufreinigung von *Nanobody*-ELP Fusionsproteinen aus Pflanzen stellen interessante Weiterentwicklungen in der *Nanobody*-Technologie dar.

8 Literaturverzeichnis

- Abbott-Laboratories, (2011): "Humira prescribing information", Abbott Park, IL, USA. <http://www.rxabbott.com/pdf/humira.pdf>, Zugriff: 05.01.2012.
- Abe, H., Goto, M. and Kamiya, N. (2010): Enzymatic single-step preparation of multifunctional proteins. *Chem Commun (Camb)* **46**(38): 7160-7162.
- Ablynx-NV (2012): "www.ablynx.com" - Zugriff: 27.1.2012.
- Ameloot, P. and Brouckaert, P. (2004): Production and characterization of receptor-specific TNF muteins. *Methods Mol Med* **98**: 33-46.
- An, Z. (2010): Monoclonal antibodies - a proven and rapidly expanding therapeutic modality for human diseases. *Protein Cell* **1**(4): 319-330.
- Arbabi Ghahroudi, M., Desmyter, A., Wyns, L., Hamers, R. and Muyldermans, S. (1997): Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. *FEBS Lett* **414**: 521-526.
- Artsaenko, O., Peisker, M., zur Nieden, U., Fiedler, U., Weiler, E. W., Muntz, K. and Conrad, U. (1995): Expression of a single-chain Fv antibody against abscisic acid creates a wilty phenotype in transgenic tobacco. *Plant J* **8**(5): 745-750.
- Baral, T. N., Magez, S., Stijlemans, B., Conrath, K., Vanhollebeke, B., Pays, E., Muyldermans, S. and De Baetselier, P. (2006): Experimental therapy of African trypanosomiasis with a nanobody-conjugated human trypanolytic factor. *Nat Med* **12**(5): 580-584.
- Baumlein, H., Wobus, U., Pustell, J. and Kafatos, F. C. (1986): The legumin gene family: structure of a B type gene of *Vicia faba* and a possible legumin gene specific regulatory element. *Nucleic Acids Res* **14**(6): 2707-2720.
- Bazl, M. R., Rasaei, M. J., Foruzandeh, M., Rahimpour, A., Kiani, J., Rahbarizadeh, F., Alirezapour, B. and Mohammadi, M. (2007): Production of chimeric recombinant single domain antibody-green fluorescent fusion protein in Chinese hamster ovary cells. *Hybridoma* **26**(1): 1-9.
- Bioinformatics, S. I. o. (2011): "ExpASy - SIB Bioinformatics Resource Portal" - Zugriff: 11.10.2011 auf http://web.expasy.org/compute_pi/.
- Böcker, W., Denk, H. and Heitz, P. U. (2004): Chronisch bakterielle Infektionskrankheiten - Mykobakterien - Tuberkulose. *Pathologie*. München, Elsevier GmbH. **3**: 1151-1154.
- Bokiej, M., Livermore, A. T., Harris, A. W., Onishi, A. C. and Sandwick, R. K. (2011): Ribose sugars generate internal glycation cross-links in horse heart myoglobin. *Biochem Biophys Res Commun* **407**(1): 191-196.
- Buchert, J., Ercili Cura, D., Ma, H., Gasparetti, C., Monogioudi, E., Faccio, G., Mattinen, M., Boer, H., Partanen, R., Selinheimo, E., Lantto, R. and Kruus, K. (2010): Crosslinking food proteins for improved functionality. *Annu Rev Food Sci Technol* **1**: 113-138.
- Caminero, A., Comabella, M. and Montalban, X. (2011): Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha), anti-TNF-alpha and demyelination revisited: an ongoing story. *J Neuroimmunol* **234**(1-2): 1-6.
- Conley, A. J., Joensuu, J. J., Richman, A. and Menassa, R. (2011): Protein body-inducing fusions for high-level production and purification of recombinant proteins in plants. *Plant Biotechnol J* **9**(4): 419-433.
- Conrad, U. and Fiedler, U. (1998): Compartment-specific accumulation of recombinant immunoglobulins in plant cells: an essential tool for antibody production and

- immunomodulation of physiological functions and pathogen activity. Plant Mol Biol **38**(1-2): 101-109.
- Conrad, U., Fiedler, U., Artsaenko, O., Phillips, J., Cunningham, C. and Porter, S. (1998): Single-chain antibodies expressed in plants. Methods in Biotechnology – Recombinant Proteins from Plants: Production and Isolation of Clinically Useful Compounds. C. Cunningham and A. Porter. Totowa, NJ (USA), Humana Press: 103-127.
- Conrad, U., Plagmann, I., Malchow, S., Sack, M., Floss, D. M., Kruglov, A. A., Nedospasov, S. A., Rose-John, S. and Scheller, J. (2011): ELPylated anti-human TNF therapeutic single-domain antibodies for prevention of lethal septic shock. Plant Biotechnol J **9**(1): 22-31.
- Conrath, K. E., Lauwereys, M., Wyns, L. and Muyldermans, S. (2001): Camel single-domain antibodies as modular building units in bispecific and bivalent antibody constructs. J Biol Chem **276**(10): 7346-7350.
- Coppieters, K., Dreier, T., Silence, K., de Haard, H., Lauwereys, M., Casteels, P., Beirnaert, E., Jonckheere, H., Van de Wiele, C., Staelens, L., Hostens, J., Revets, H., Remaut, E., Elewaut, D. and Rottiers, P. (2006): Formatted anti-tumor necrosis factor alpha VHH proteins derived from camelids show superior potency and targeting to inflamed joints in a murine model of collagen-induced arthritis. Arthritis Rheum **54**(6): 1856-1866.
- Cortez-Retamozo, V., Lauwereys, M., Hassanzadeh Gh, G., Gobert, M., Conrath, K., Muyldermans, S., De Baetselier, P. and Revets, H. (2002): Efficient tumor targeting by single-domain antibody fragments of camels. Int J Cancer **98**(3): 456-462.
- Creative-Biolabs (2011): "Single Domain Antibody Library Services" - Zugriff: 27.1.2012 auf <http://www.creative-biolabs.com/single-domain-antibody.htm>.
- Davies, J. and Riechmann, L. (1994): 'Camelising' human antibody fragments: NMR studies on VH domains. FEBS Lett **339**(3): 285-290.
- Deblaere, R., Bytebier, B., De Greve, H., Deboeck, F., Schell, J., Van Montagu, M. and Leemans, J. (1985): Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for Agrobacterium-mediated gene transfer to plants. Nucleic Acids Res **13**(13): 4777-4788.
- Dennis, M. S., Zhang, M., Meng, Y. G., Kadkhodayan, M., Kirchhofer, D., Combs, D. and Damico, L. A. (2002): Albumin binding as a general strategy for improving the pharmacokinetics of proteins. J Biol Chem **277**(38): 35035-35043.
- Desmyter, A., Decanniere, K., Muyldermans, S. and Wyns, L. (2001): Antigen specificity and high affinity binding provided by one single loop of a camel single-domain antibody. J Biol Chem **276**(28): 26285-26290.
- Doi, K., Leelahavanichkul, A., Yuen, P. S. and Star, R. A. (2009): Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury. J Clin Invest **119**(10): 2868-2878.
- Dreher, M. R., Liu, W., Michelich, C. R., Dewhirst, M. W. and Chilkoti, A. (2007): Thermal cycling enhances the accumulation of a temperature-sensitive biopolymer in solid tumors. Cancer Res **67**(9): 4418-4424.
- Drucker, A., Skedgel, C., Virik, K., Rayson, D., Sellon, M. and Younis, T. (2008): The cost burden of trastuzumab and bevacizumab therapy for solid tumours in Canada. Curr Oncol **15**(3): 136-142.
- Dübel, S. (2007): Introduction - The Gold Rush. Handbook of Therapeutic Antibodies. S. Dübel. Weinheim, Wiley-VCH Verlag. **1 - Technologies: 8.**
- Dumoulin, M., Conrath, K., Van Meirhaeghe, A., Meersman, F., Heremans, K., Frenken, L. G., Muyldermans, S., Wyns, L. and Matagne, A. (2002): Single-domain antibody fragments with high conformational stability. Protein Sci **11**(3): 500-515.

-
- Eck, M. J. and Sprang, S. R. (1989): The structure of tumor necrosis factor-alpha at 2.6 Å resolution. Implications for receptor binding. *J Biol Chem* **264**(29): 17595-17605.
- Ehlers, S. (2003): Role of tumour necrosis factor (TNF) in host defence against tuberculosis: implications for immunotherapies targeting TNF. *Ann Rheum Dis* **62 Suppl 2**: ii37-42.
- Emberly, E. G., Mukhopadhyay, R., Tang, C. and Wingreen, N. S. (2004): Flexibility of beta-sheets: principal component analysis of database protein structures. *Proteins* **55**(1): 91-98.
- European-Bioinformatics-Institute (2012): "ClustalW2 - Multiple Sequence Alignment" - Zugriff: 13.02.2012 auf <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>.
- Fleischmann, R., Nayiager, S., Louw, I., Rojkovich, B., Fu, C., Udata, C. and al, e. (2011). A Multiple Ascending Dose/Proof of Concept Study of ATN-103 (ozoralizumab) in Rheumatoid Arthritis Subjects on a Background of Methotrexate. [abstract]. *Arthritis & Rheumatism 2011 - Annual Scientific Meeting*. Chicago, Illinois, USA. **Volume 63 Suppl 10 :2630**.
- Floss, D. M., Sack, M., Stadlmann, J., Rademacher, T., Scheller, J., Stöger, E., Fischer, R. and Conrad, U. (2008): Biochemical and functional characterization of anti-HIV antibody-ELP fusion proteins from transgenic plants. *Plant Biotech J* **6**(4): 379-391.
- Floss, D. M., Schallau, K., Rose-John, S., Conrad, U. and Scheller, J. (2010): Elastin-like polypeptides revolutionize recombinant protein expression and their biomedical application. *Trends Biotechnol* **28**(1): 37-45.
- Fontana, A., Spolaore, B., Mero, A. and Veronese, F. M. (2008): Site-specific modification and PEGylation of pharmaceutical proteins mediated by transglutaminase. *Adv Drug Deliv Rev* **60**(1): 13-28.
- Forsman, A., Beirnaert, E., Aasa-Chapman, M. M., Hoorelbeke, B., Hijazi, K., Koh, W., Tack, V., Szynol, A., Kelly, C., McKnight, A., Verrips, T., de Haard, H. and Weiss, R. A. (2008): Llama antibody fragments with cross-subtype human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-neutralizing properties and high affinity for HIV-1 gp120. *J Virol* **82**(24): 12069-12081.
- Frenken, L. G., van der Linden, R. H., Hermans, P. W., Bos, J. W., Ruuls, R. C., de Geus, B. and Verrips, C. T. (2000): Isolation of antigen specific llama VHH antibody fragments and their high level secretion by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biotechnol* **78**(1): 11-21.
- Furutani, Y., Kato, A., Notoya, M., Ghoneim, M. A. and Hirose, S. (2001): A simple assay and histochemical localization of transglutaminase activity using a derivative of green fluorescent protein as substrate. *J Histochem Cytochem* **49**(2): 247-258.
- Gahrtz, M. and Conrad, U. (2009a): Immunomodulation of plant function by in vitro selected single-chain Fv intrabodies. *Methods in Molecular Biology: Recombinant proteins from plants*. L. Faye and V. Gomord. Totowa, USA, Humana Press. **483**: 289-312.
- Gahrtz, M. and Conrad, U. (2009b): Immunomodulation of plant function by in vitro selected single-chain Fv intrabodies. *Methods Mol Biol* **483**: 289-312.
- Galimov, A. R., Kruglov, A. A., Bol'sheva, N. L., Iurkevich, O., Lipin'sh, D., Mufazalov, I. A., Kuprash, D. V. and Nedospasov, S. A. (2008): Chromosomal localization and molecular organization of human genomic fragment containing TNF/LT locus in transgenic mice. *Mol Biol (Mosk)* **42**(4): 629-638.
- Gibbs, W. W. (2006): Nützliche Winzlinge. *Spektrum der Wissenschaft*: 5.
- Graff, C. P. and Wittrup, K. D. (2003): Theoretical Analysis of Antibody Targeting of Tumor Spheroids *Cancer Res* **63**: 1288-1296.

-
- Greenberg, A. S., Avila, D., Hughes, M., Hughes, A., McKinney, E. C. and Flajnik, M. F. (1995): A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks. Nature **374**(6518): 168-173.
- Guicciardi, M. E. and Gores, G. J. (2009): Life and death by death receptors. FASEB J **23**(6): 1625-1637.
- Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hamers, C., Songa, E. B., Bendahman, N. and Hamers, R. (1993): Naturally occurring antibodies devoid of light chains. Nature **363**(6428): 446-448.
- Harmsen, M. M. and De Haard, H. J. (2007): Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. Appl Microbiol Biotechnol **77**(1): 13-22.
- Harmsen, M. M., van Solt, C. B., Fijten, H. P., van Keulen, L., Rosalia, R. A., Weerdmeester, K., Cornelissen, A. H., De Bruin, M. G., Eble, P. L. and Dekker, A. (2007): Passive immunization of guinea pigs with llama single-domain antibody fragments against foot-and-mouth disease. Vet Microbiol **120**(3-4): 193-206.
- Harmsen, M. M., van Solt, C. B., van Zijderveld-van Bommel, A. M., Niewold, T. A. and van Zijderveld, F. G. (2006): Selection and optimization of proteolytically stable llama single-domain antibody fragments for oral immunotherapy. Appl Microbiol Biotechnol **72**(3): 544-551.
- Hauser, P. S. and Ryan, R. O. (2007): Expressed protein ligation using an N-terminal cysteine containing fragment generated in vivo from a pelB fusion protein. Protein Expr Purif **54**(2): 227-233.
- Hausmann, J., Horackova, J. and Deyl, Z. (1986): Effect of intramolecular S-S bond cleavage upon the mobility of proteins in sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis. J Chromatogr **377**: 361-367.
- Hehlghans, T. and Pfeffer, K. (2005): The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. Immunology **115**: 1-20.
- Herold, G. (2010). Gastroenterologie - chron. entzündl. Darmerkrankungen, Rheumatologie - Rheumatoide Arthritis Innere Medizin. Köln, Dr. med. Gerd Herold: Morbus Crohn/Colitis ulcerosa: 461-468, Rheumatoide Arthritis: 629-637.
- Heyninck, K. and Beyaert, R. (2001): Crosstalk between NF-kappaB-activating and apoptosis-inducing proteins of the TNF-receptor complex. Mol Cell Biol Res Commun **4**(5): 259-265.
- Hmila, I., Abdallah, R. B., Saerens, D., Benlasfar, Z., Conrath, K., Ayeb, M. E., Muyldermans, S. and Bouhaouala-Zahar, B. (2008): VHH, bivalent domains and chimeric Heavy chain-only antibodies with high neutralizing efficacy for scorpion toxin AaH1. Mol Immunol **45**(14): 3847-3856.
- Horsch, R. B., Fry, J. E., Hoffmann, N. L., Eichholtz, D., Rogers, S. G. and Fraley, R. T. (1985): A Simple and General Method for Transferring Genes into Plants. Science **227**(4691): 1229-1231.
- Huang, L., Gai, L. O., Caveliers, V., Vanhove, C., Keyaerts, M., De Baetselier, P., Bossuyt, A., Revets, H. and Lahoutte, T. (2008): SPECT imaging with ^{99m}Tc-labeled EGFR-specific nanobody for in vivo monitoring of EGFR expression. Mol Imaging Biol **10**(3): 167-175.
- Ibanez, L. I., De Filette, M., Hultberg, A., Verrips, T., Temperton, N., Weiss, R. A., Vandeveld, W., Schepens, B., Vanlandschoot, P. and Saelens, X. (2011): Nanobodies with in vitro neutralizing activity protect mice against H5N1 influenza virus infection. J Infect Dis **203**(8): 1063-1072.

-
- Idriss, H. T. and Naismith, J. H. (2000): TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). Microsc Res Tech **50**(3): 184-195.
- Janssen-Biologics, (2009a): "Remicade: EPAR - Product Information", Leiden, Niederlande. European Medicines Agency (EMA), EMEA/H/C/000240, last updated 13.12.2011, <http://www.ema.europa.eu>, Zugriff: 05.01.2012.
- Janssen-Biologics, (2009b): "Simponi: EPAR - Product Information", Leiden, Niederlande. European Medicines Agency (EMA), EMEA/H/C/000992, last updated 05.10.2011, <http://www.ema.europa.eu>, Zugriff: 05.01.2012.
- Jobling, S. A., Jarman, C., Teh, M. M., Holmberg, N., Blake, C. and Verhoeyen, M. E. (2003): Immunomodulation of enzyme function in plants by single-domain antibody fragments. Nat Biotechnol **21**(1): 77-80.
- Joensuu, J. J., Brown, K. D., Conley, A. J., Clavijo, A., Menassa, R. and Brandle, J. E. (2009): Expression and purification of an anti-Foot-and-mouth disease virus single chain variable antibody fragment in tobacco plants. Transgenic Res **18**(5): 685-696.
- Joosten, V., Roelofs, M. S., van den Dries, N., Goosen, T., Verrips, C. T., van den Hondel, C. A. and Lokman, B. C. (2005): Production of bifunctional proteins by *Aspergillus awamori*: llama variable heavy chain antibody fragment (V(HH)) R9 coupled to *Arthromyces ramosus* peroxidase (ARP). J Biotechnol **120**(4): 347-359.
- Kabat, E. A. and Wu, T. T. (1991): Identical V region amino acid sequences and segments of sequences in antibodies of different specificities. Relative contributions of VH and VL genes, minigenes, and complementarity-determining regions to binding of antibody-combining sites. J Immunol **147**(5): 1709-1719.
- Kamiya, N., Abe, H., Goto, M., Tsuji, Y. and Jikuya, H. (2009): Fluorescent substrates for covalent protein labeling catalyzed by microbial transglutaminase. Org Biomol Chem **7**(17): 3407-3412.
- Kamiya, N., Takazawa, T., Tanaka, T., Ueda, H. and Nagamune, T. (2003a): Site-specific cross-linking of functional proteins by transglutamination. Enzyme Microb Technol **33**(4): 492-496.
- Kamiya, N., Tanaka, T., Suzuki, T., Takazawa, T., Takeda, S., Watanabe, K. and Nagamune, T. (2003b): S-peptide as a potent peptidyl linker for protein cross-linking by microbial transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis*. Bioconjug Chem **14**(2): 351-357.
- Karow, T. (2009a): *Arzneitherapie in der Gastroenterologie - Chronisch entzündliche Darmerkrankungen, Analgetika und Schmerztherapie - Rheumatoide Arthritis. Pharmakologie und Toxikologie*. Köln, Dr. med Thomas Karow. **17. Auflage**: Chron. entzündl. Darmerkrankungen: 428-431, Rheumatoide Arthritis: 607-616.
- Karow, T. (2009b): *Immunsuppressiva - Zytokine - Interferone. Pharmakologie und Toxikologie*. Köln, Dr. med Thomas Karow. **17. Auflage**: Interferone: 890-893.
- KBV, (2010): "Wirkstoff aktuell: Biologische DMARDs (Disease Modifying Antirheumatic Drugs oder „Basistherapeutika“)", Berlin. Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV) in Kooperation mit der ARZNEIMITTELKOMMISSION DER DEUTSCHEN ÄRZTESCHAFT, Ausgabe 7/2010, Zugriff.
- Kolkman, J. A. and Law, D. A. (2010): Nanobodies – from llamas to therapeutic proteins. Drug Discov Today **7**(2): e139-e146.
- Kuprash, D. V., Alimzhanov, M. B., Tumanov, A. V., Grivennikov, S. I., Shakhov, A. N., Drutskaya, L. N., Marino, M. W., Turetskaya, R. L., Anderson, A. O., Rajewsky, K., Pfeffer, K. and Nedospasov, S. A. (2002): Redundancy in tumor necrosis factor (TNF) and lymphotoxin (LT) signaling in vivo: mice with inactivation of the entire TNF/LT locus versus single-knockout mice. Mol Cell Biol Res Commun **22**(24): 8626-8634.

-
- Lauwereys, M., Arbabi Ghahroudi, M., Desmyter, A., Kinne, J., Hölzer, W., De Genst, E., Wyns, L. and Muyldermans, S. (1998): Potent enzyme inhibitors derived from dromedary heavy-chain antibodies. EMBO J **17**(13): 3512-3520.
- Ledford, H. (2008): Monoclonal antibodies come of age. Nature **455**(7212): 437.
- Lee, L. Y. and Gelvin, S. B. (2008): T-DNA binary vectors and systems. Plant Physiol **146**(2): 325-332.
- Lewis, M., Tartaglia, L. A., Lee, A., Bennett, G. L., Rice, G. C., Wong, G. H., Chen, E. Y. and Goeddel, D. V. (1991): Cloning and expression of cDNAs for two distinct murine tumor necrosis factor receptors demonstrate one receptor is species specific. Proc Natl Acad Sci U S A **88**(7): 2830-2834.
- Löffler, G., Petrides, P. E., (2003): Endokrine Funktionen II: Zytokine - TNF Signaltransduktion. Biochemie und Pathobiochemie. Berlin Heidelberg New York, Springer Verlag. **7. Auflage:** 824.
- Ma, J. K., Drake, P. M. and Christou, P. (2003): The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. Nat Rev Genet **4**(10): 794-805.
- Manning, M. and Colon, W. (2004): Structural basis of protein kinetic stability: resistance to sodium dodecyl sulfate suggests a central role for rigidity and a bias toward beta-sheet structure. Biochemistry (Mosc) **43**(35): 11248-11254.
- Marquardt, A., Muyldermans, S. and Przybylski, M. (2006): A synthetic camel anti-lysozyme peptide antibody (peptibody) with flexible loop structure identified by high-resolution affinity mass spectrometry. Chemistry **12**(7): 1915-1923.
- Mero, A., Spolaore, B., Veronese, F. M. and Fontana, A. (2009): Transglutaminase-mediated PEGylation of proteins: direct identification of the sites of protein modification by mass spectrometry using a novel monodisperse PEG. Bioconjug Chem **20**(2): 384-389.
- Meyer, D. E. and Chilkoti, A. (1999): Purification of recombinant proteins by fusion with thermally-responsive polypeptides. Nat Biotechnol **17**(11): 1112-1115.
- Moriyama, K., Sung, K., Goto, M. and Kamiya, N. (2011): Immobilization of alkaline phosphatase on magnetic particles by site-specific and covalent cross-linking catalyzed by microbial transglutaminase. J Biosci Bioeng **111**(6): 650-653.
- Munro, S. and Pelham, H. R. (1987): A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. Cell **48**(5): 899-907.
- Murphy, K., Travers, P. and Walport, M. (2008a): Antigen Recognition by B-cell und T-cell Receptors - "The structure of a typical antibody molecule." & "The interaction of the antibody molecule with specific antigen.". Janeway's Immunobiology. New York and London, Garland Science, Taylor & Francis Group. **7th edition:** 112-123.
- Murphy, K., Travers, P. and Walport, M. (2008b): Innate Immunity - "TNF α is an important cytokine that triggers local containment of infection but induces shock when released systemically" & "Cytokines released by phagocytes activate the acute-phase response". Janeway's Immunobiology. New York and London, Garland Science, Taylor & Francis Group. **7th edition:** 90-94.
- Muruganandam, A., Tanha, J., Narang, S. and Stanimirovic, D. (2002): Selection of phage-displayed llama single-domain antibodies that transigrate across human blood-brain barrier endothelium. FASEB J **16**(2): 240-242.
- Muyldermans, S. (2001): Single domain camel antibodies: current status. J Biotechnol **74**(4): 277-302.

-
- Muyldermans, S., Atarhouch, T., Saldanha, J., Barbosa, J. A. and Hamers, R. (1994): Sequence and structure of VH domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains. Protein Eng **7**(9): 1129-1135.
- N-Zyme-BioTec-GmbH, (2007): "Recombinant bacterial transglutaminase - Product data sheet", Zugriff.
- NATURE-MEDICINE (2012): Biologic drugs set to top 2012 sales. Nat Med **18**(5): 636.
- Odell, J. T., Nagy, F. and Chua, N. H. (1985): Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promotor. Nature **313**(6005): 810-812.
- Perez, J. M., Renisio, J. G., Prompers, J. J., van Platerink, C. J., Cambillau, C., Darbon, H. and Frenken, L. G. (2001): Thermal unfolding of a llama antibody fragment: a two-state reversible process. Biochemistry (Mosc) **40**(1): 74-83.
- Peschon, J. J., Slack, J. L., Reddy, P., Stocking, K. L., Sunnarborg, S. W., Lee, D. C., Russell, W. E., Castner, B. J., Johnson, R. S., Fitzner, J. N., Boyce, R. W., Nelson, N., Kozlosky, C. J., Wolfson, M. F., Rauch, C. T., Cerretti, D. P., Paxton, R. J., March, C. J. and Black, R. A. (1998a): An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. Science **282**(5392): 1281-1284.
- Peschon, J. J., Tarrance, D. S., Stocking, K. L., Glaccum, M. B., Otten, C., Willis, C. R., Charrier, K., Morrissey, P. J., Ware, C. B. and Mohler, K. M. (1998b): TNF receptor-deficient mice reveal divergent roles for p55 and p75 in several models of inflammation. J Immunol **160**(2): 943-952.
- Pfizer, (2009): "Enbrel: EPAR - Product Information", Kent, UK. European Medicines Agency (EMA), EMEA/H/C/000262, last updated 26.09.2011 <http://www.ema.europa.eu>, Zugriff: 05.01.2012.
- Pfizer, (2011): "ENBREL U.S. Physician Prescribing Information", NY. http://pi.amgen.com/united_states/enbrel/derm/enbrel_pi.pdf, Zugriff: 29.08.2011.
- Plagmann, I., Chalaris, A., Kruglov, A. A., Nedospasov, S., Rosenstiel, P., Rose-John, S. and Scheller, J. (2009): Transglutaminase-catalyzed covalent multimerization of Camelidae anti-human TNF single domain antibodies improves neutralizing activity. J Biotechnol **142**(2): 170-178.
- Pluckthun, A. and Pack, P. (1997): New protein engineering approaches to multivalent and bispecific antibody fragments. Immunotechnology **3**: 83-105.
- Putnam, C. (2006, March 28, 2006): "PROTEIN CALCULATOR v3.3" - auf <http://www.scripps.edu/~cdputnam/protecalc.html>.
- Reichert, J. M. and Valge-Archer, V. E. (2007): Development trends for monoclonal antibody cancer therapeutics. Nat Rev Drug Discov **6**(5): 349-356.
- Riechmann, L. and Muyldermans, S. (1999): Single domain antibodies: comparison of camel VH and camelised human VH domains. J Immunol Methods **231**(1-2): 25-38.
- Rittirsch, D., Hoesel, L. M. and Ward, P. A. (2007): The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. J Leukoc Biol **81**(1): 137-143.
- Roovers, R. C., Laeremans, T., Huang, L., De Taeye, S., Verkleij, A. J., Revets, H., de Haard, H. J. and van Bergen en Henegouwen, P. M. (2007): Efficient inhibition of EGFR signalling and of tumour growth by antagonistic anti-EGFR Nanobodies. Cancer Immunol Immunother **56**(3): 303-317.
- Scheller, J., Guhrs, K. H., Grosse, F. and Conrad, U. (2001): Production of spider silk proteins in tobacco and potato. Nat Biotechnol **19**(6): 573-577.
- Scheller, J., Henggeler, D., Viviani, A. and Conrad, U. (2004): Purification of spider silk-elastin from transgenic plants and application for human chondrocyte proliferation. Transgenic Res **13**: 51-57.

-
- Scheller, J., Leps, M. and Conrad, U. (2006): Forcing single-chain variable fragment production in tobacco seeds by fusion to elastin-like polypeptides Plant Biotech J **4**(2): 243-247.
- Serrano, V., Liu, W. and Franzen, S. (2007): An infrared spectroscopic study of the conformational transition of elastin-like polypeptides. Biophys J **93**(7): 2429-2435.
- Shamji, M. F., Whitlatch, L., Friedman, A. H., Richardson, W. J., Chilkoti, A. and Setton, L. A. (2008): An injectable and in situ-gelling biopolymer for sustained drug release following perineural administration. Spine (Phila Pa 1976) **33**(7): 748-754.
- Shimazu, M., Mulchandani, A. and Chen, W. (2003): Thermally triggered purification and immobilization of elastin-OPH fusions. Biotechnol Bioeng **81**(1): 74-79.
- Silence, K., Lauwereys, M. and De Haard, H. (2007). Single domain antibodies directed against tumour necrosis factor-alpha and uses therefor. U. S. P. T. Office. US, Ablynx N.V., Ghent-Zwijnaarde (BE). **US20070077249A1**.
- Smith, C. A., Farrah, T. and Goodwin, R. G. (1994): The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. Cell **76**(6): 959-962.
- Stijlemans, B., Conrath, K., Cortez-Retamozo, V., Van Xong, H., Wyns, L., Senter, P., Revets, H., De Baetselier, P., Muyldermans, S. and Magez, S. (2004): Efficient targeting of conserved cryptic epitopes of infectious agents by single domain antibodies. African trypanosomes as paradigm. J Biol Chem **279**(2): 1256-1261.
- Stuhlmann-Laeisz, C., Lang, S., Chalaris, A., Krzysztow, P., Enge, S., Eichler, J., Klingmuller, U., Samuel, M., Ernst, M., Rose-John, S. and Scheller, J. (2006): Forced dimerization of gp130 leads to constitutive STAT3 activation, cytokine-independent growth, and blockade of differentiation of embryonic stem cells. Mol Biol Cell **17**(7): 2986-2995.
- Sugimura, Y., Yokoyama, K., Nio, N., Maki, M. and Hitomi, K. (2008): Identification of preferred substrate sequences of microbial transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* using a phage-displayed peptide library. Arch Biochem Biophys **477**(2): 379-383.
- Tagami, U., Shimba, N., Nakamura, M., Yokoyama, K., Suzuki, E. and Hirokawa, T. (2009): Substrate specificity of microbial transglutaminase as revealed by three-dimensional docking simulation and mutagenesis. Protein Eng Des Sel **22**(12): 747-752.
- Takazawa, T., Kamiya, N., Ueda, H. and Nagamune, T. (2004): Enzymatic labeling of a single chain variable fragment of an antibody with alkaline phosphatase by microbial transglutaminase. Biotechnol Bioeng **86**(4): 399-404.
- Tal, M., Silberstein, A. and Nusser, E. (1985): Why does Coomassie Brilliant Blue R interact differently with different proteins? A partial answer. J Biol Chem **260**(18): 9976-9980.
- Tanaka, T., Kamiya, N. and Nagamune, T. (2004): Peptidyl linkers for protein heterodimerization catalyzed by microbial transglutaminase. Bioconjug Chem **15**(3): 491-497.
- Teh, Y. H. and Kavanagh, T. A. (2010): High-level expression of Camelid nanobodies in *Nicotiana benthamiana*. Transgenic Res **19**(4): 575-586.
- Tijink, B. M., Laeremans, T., Budde, M., Stigter-van Walsum, M., Dreier, T., de Haard, H. J., Leemans, C. R. and van Dongen, G. A. (2008): Improved tumor targeting of anti-epidermal growth factor receptor Nanobodies through albumin binding: taking advantage of modular Nanobody technology. Mol Cancer Ther **7**(8): 2288-2297.
- Tominaga, J., Kamiya, N. and Goto, M. (2007): An enzyme-labeled protein polymer bearing pendent haptens. Bioconjug Chem **18**(3): 860-865.

-
- Tracey, D., Klareskog, L., Sasso, E. H., Salfeld, J. G. and Tak, P. P. (2008): Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. Pharmacol Ther **117**(2): 244-279.
- Tzfira, T. and Citovsky, V. (2006): Agrobacterium-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. Curr Opin Biotechnol **17**(2): 147-154.
- UCB-Pharma, (2010): "Cimzia: EPAR - Product Information", Braine l'Alleud, Belgium. European Medicines Agency (EMA), EMEA/H/C/001037, last updated 08.12.2011 <http://www.ema.europa.eu>, Zugriff: 05.01.2012.
- UCB, (2011): "Cimzia US prescribing information", Smyrna, GA, USA. http://www.ucb.com/_up/ucb_com_products/documents/Cimzia_COL_%2009_2011_MG_%2009_2011.pdf, Zugriff: 05.01.2012.
- Urry, D. W., Parker, T. M., Reid, M. C. and Gowda, D. C. (1991): Biocompatibility of the Bioelastic Materials, Poly(GVGVP) and Its $\{\gamma\}$ -Irradiation Cross-Linked Matrix: Summary of Generic Biological Test Results J Bioact Compat Polym **6**(3): 263-282.
- van der Linden, R. H., Frenken, L. G., de Geus, B., Harmsen, M. M., Ruuls, R. C., Stok, W., de Ron, L., Wilson, S., Davis, P. and Verrips, C. T. (1999): Comparison of physical chemical properties of llama VHH antibody fragments and mouse monoclonal antibodies. Biochim Biophys Acta **1431**(1): 37-46.
- van der Vaart, J. M., Pant, N., Wolvers, D., Bezemer, S., Hermans, P. W., Bellamy, K., Sarker, S. A., van der Logt, C. P., Svensson, L., Verrips, C. T., Hammarstrom, L. and van Klinken, B. J. (2006): Reduction in morbidity of rotavirus induced diarrhoea in mice by yeast produced monovalent llama-derived antibody fragments. Vaccine **24**(19): 4130-4137.
- Vincke, C., Loris, R., Saerens, D., Martinez-Rodriguez, S., Muyldermans, S. and Conrath, K. (2009): General Strategy to Humanize a Camelid Single-domain Antibody and Identification of a Universal Humanized Nanobody Scaffold. J Biol Chem **284**(5): 3273-3284.
- Wajant, H., Pfizenmaier, K. and Scheurich, P. (2003): Tumor necrosis factor signaling. Cell Death Differ **10**(1): 45-65.
- Walker, J. M. and Rapley, R. (2008): Protein Electrophoresis: SDS-PAGE. Molecular Biomethods Handbook. Totowa, NJ (US), Humana Press. **2nd Volume**: 360-364.
- Wesolowski, J., Alzogaray, V., Reyelt, J., Unger, M., Juarez, K., Urrutia, M., Cauerhff, A., Danquah, W., Rissiek, B., Scheuplein, F., Schwarz, N., Adriouch, S., Boyer, O., Seman, M., Licea, A., Serreze, D. V., Goldbaum, F. A., Haag, F. and Koch-Nolte, F. (2009): Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. Med Microbiol Immunol **198**(3): 157-174.
- Xiang, C., Han, P., Lutziger, I., Wang, K. and Oliver, D. J. (1999): A mini binary vector series for plant transformation. Plant Mol Biol **40**(4): 711-717.
- Yokoyama, K., Nio, N. and Kikuchi, Y. (2004): Properties and applications of microbial transglutaminase. Appl Microbiol Biotechnol **64**(4): 447-454.
- Zambryski, P., Joos, H., Genetello, C., Leemans, J., Montagu, M. V. and Schell, J. (1983): Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. EMBO J **2**(12): 2143-2150.
- Zhu, Y. and Tramper, J. (2008): Novel applications for microbial transglutaminase beyond food processing. Trends Biotechnol **26**(10): 559-565.

9 Danksagung

Es war eine inspirierende und motivierende Zeit im Biochemischen Institut, an die ich mich gerne zurück erinnere. Dafür möchte ich mich bei denen bedanken, ohne die meine Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Zu Allererst bedanke ich mich bei Prof. Dr. Jürgen Scheller für seine exzellente und sehr nette Betreuung, die erfahrene Unterstützung und nicht zuletzt seine Geduld sehr herzlich.

Ebenso gilt mein herzlicher Dank meinem Doktorvater Prof. Dr. Stefan Rose-John für die Übernahme meiner Doktorvaterschaft und die freundliche Beratung in nicht nur auf die Doktorarbeit bezogenen Themen.

Ich bedanke mich darüber hinaus bei Herrn Prof. Dr. Joachim Grötzinger für die hilfreichen Gespräche und die vielfältigen Hilfen bei schwierigen Fragestellungen.

Ich bedanke mich auch bei Frau Dr. Athena Chalaris, Frau Dr. Nina Adam, Frau Dr. Jessica Gewiese, Herrn Dr. Jan Suthaus, Herrn Dr. Sven Malchow, Herrn Dr. Christoph Garbers, Frau Dr. Inken Lorenzen, Herrn Dr. Björn Spudy, Herrn Dr. Sascha Jung und Herrn Dr. Matthias Michalek für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe sowie ihre Bereitschaft mir bei Fragen und Problemen hilfreich beiseite zu stehen.

Ich bedanke mich bei Frau Stefanie Schnell für die äußerst nette Zusammenarbeit und ihre vielfältige aktive Hilfe bei meiner Dissertation.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei Frau Maike Kanter und Frau Petra Voß für die vielen freundlichen und unkomplizierten Hilfestellungen in jeder Hinsicht.

Herrn Prof. Dr. Philip Rosenstiel und seinen Mitarbeitern im Institut für klinische Molekularbiologie an der CAU Kiel danke ich für die Kooperation bei der Untersuchung der Proteineigenschaften der *Nanobody*-Varianten.

Herrn Prof. Sergej Nedospasov und Dr. Andrei A. Kruglov vom Deutschen Rheumaforschungszentrum Berlin danke ich für die Zusammenarbeit bei den *in vivo* Experimenten.

Herrn Priv.-Doz. Dr. Udo Conrad und seinen Mitarbeitern aus der AG Phytoantikörper im Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) Gatersleben danke ich für die Durchführung der pflanzenbiochemischen Methoden.

Herrn Dr. Christoph Gelhaus aus dem Zoologischen Institut der CAU Kiel danke ich für die Durchführung der Massenspektrometrie.

Frau Dr. Inken Lorenzen, Herrn Dr. Björn Spudy, Herrn Dr. Sascha Jung und Herrn Dr. Matthias Michalek danke ich für die vielfältige Hilfe insbesondere bei der Reinigung der Proteine. Ebenso bedanke ich mich in diesem Zusammenhang bei Frau Britta Hansen für ihre Geduld und Hilfe.

Bei allen weiteren hier nicht Genannten, die mich in der Zeit meiner Dissertation und bei der Niederschrift unterstützt haben, möchte ich hiermit ebenfalls herzlich bedanken.

10 Lebenslauf

Ingo Plagmann – *31.05.1984 (Kiel)

Schullaufbahn

1990 – 2003 Grundschule Neuwittenbek / Gymnasium Kronshagen
06.06.2003 Abitur (Note: 1,0)

Zivildienst

07.2003 – 09.2004 „Anderer Dienst im Ausland“ in Cayambe, Ecuador
Betreuung, Beratung und Weiterbildung von Frauengruppen in
ländlichen Regionen, Englischunterricht im lokalen
Kindergarten

Hochschullaufbahn

10.2004 – 06.2011 Medizinstudium in Kiel
23.08. 2006 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung – Note 1,0
02.2010 – 01.2011 Praktisches Jahr
 Innere Medizin (FEK Neumünster)
 Neurologie (UKSH Kiel)
 Chirurgie (WKK Heide)
21.06.2011 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung – Note 1,33
(schriftliche Note 1, mündliche Note 2)

Wissenschaftliche Tätigkeit

09.2006 Forschungspraktikum: molekulare Neurophysiologie, Prof. Dr.
C. Rosenmund am Baylor College of Medicine Houston, Texas
(4-wöchig)
07.2007 – 07.2008 Promotion - experimenteller Teil im Biochemischen Institut Kiel
bei Prof. Dr. S. Rose-John
12.2011 – 02.2012 Niederschrift der Dissertation

Weitere Interessen und Fähigkeiten

Soziales Engagement

WS07/08 - WS09/10 Lokalprojektleitung „Mit Sicherheit verliebt“ Kiel –
Aufklärungsprojekt der Bundesvertretung der
Medizinstudierenden in Deutschland e.V. (ab WS 06/07 bereits
Schulbesuche)

Stipendien

Studienstiftung des deutschen Volkes
MLP-Stipendium Medical Excellence - Studies Excellence

Sprachen

Englisch (verhandlungssicher), Spanisch (fließend), Französisch
(Grundkenntnisse)

Hobbies / Interessen Handball, Karate, Ornithologie

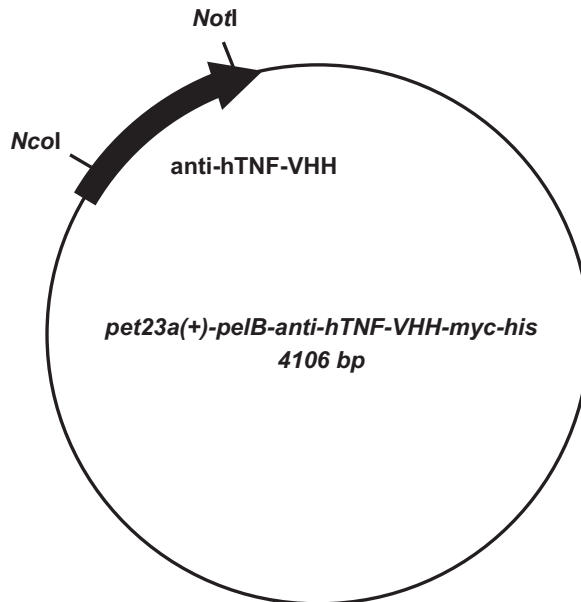
11 Veröffentlichungen

Plagmann, I., Chalaris, A., Kruglov, A. A., Nedospasov, S., Rosenstiel, P., Rose-John, S. and Scheller, J. (2009): Transglutaminase-catalyzed covalent multimerization of Camelidae anti-human TNF single domain antibodies improves neutralizing activity. J Biotechnol **142**(2): 170-178.

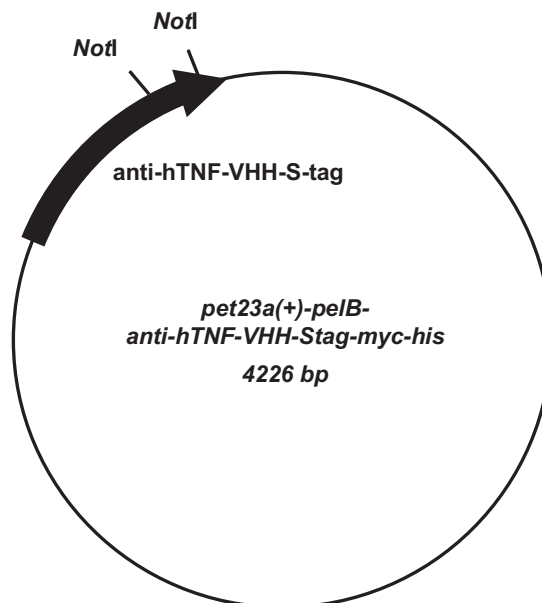
Conrad, U., Plagmann, I., Malchow, S., Sack, M., Floss, D. M., Kruglov, A. A., Nedospasov, S. A., Rose-John, S. and Scheller, J. (2011): ELPylated anti-human TNF therapeutic single-domain antibodies for prevention of lethal septic shock. Plant Biotechnol J **9**(1): 22-31.

12 Anhang

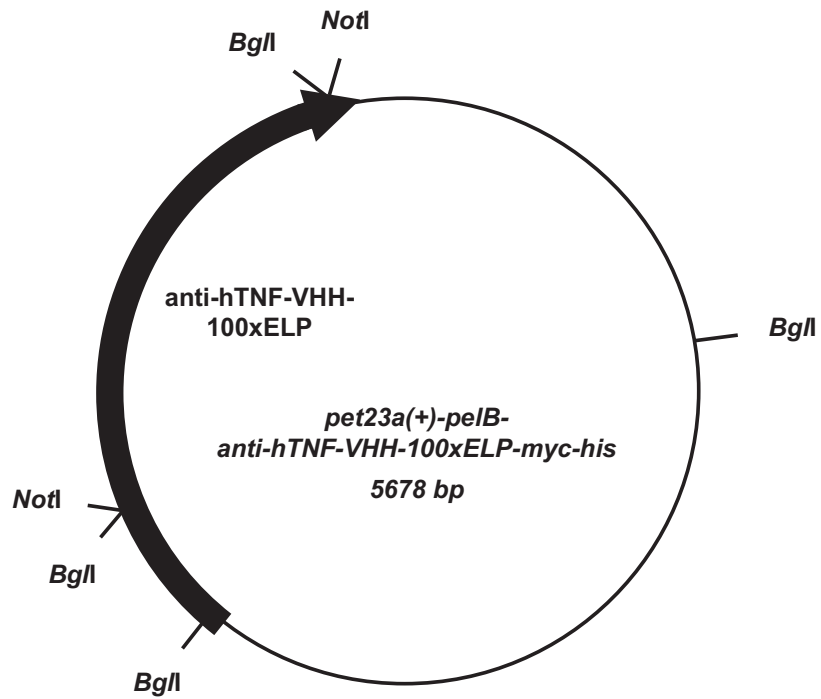
pet23a(+)-pelB-anti-hTNF-VHH-myc-his



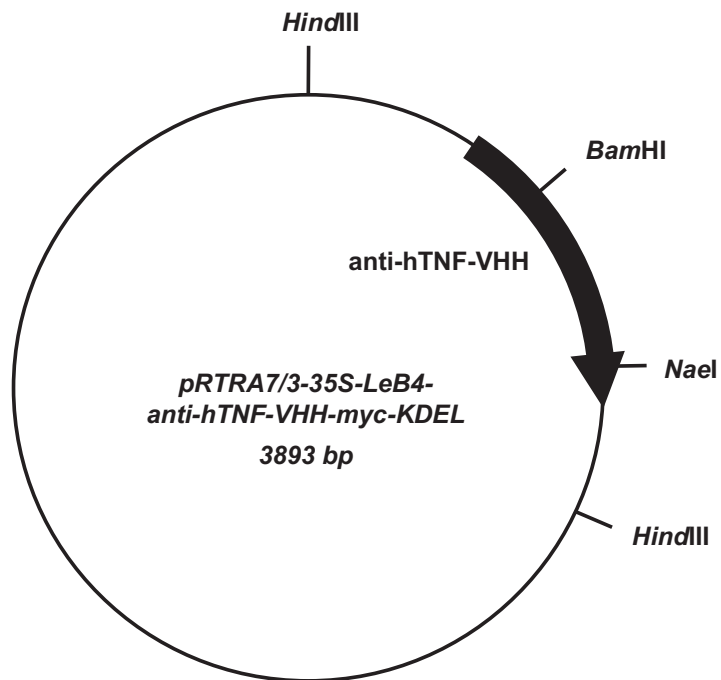
pet23a(+)-pelB-anti-hTNF-VHH-Stag-myc-his



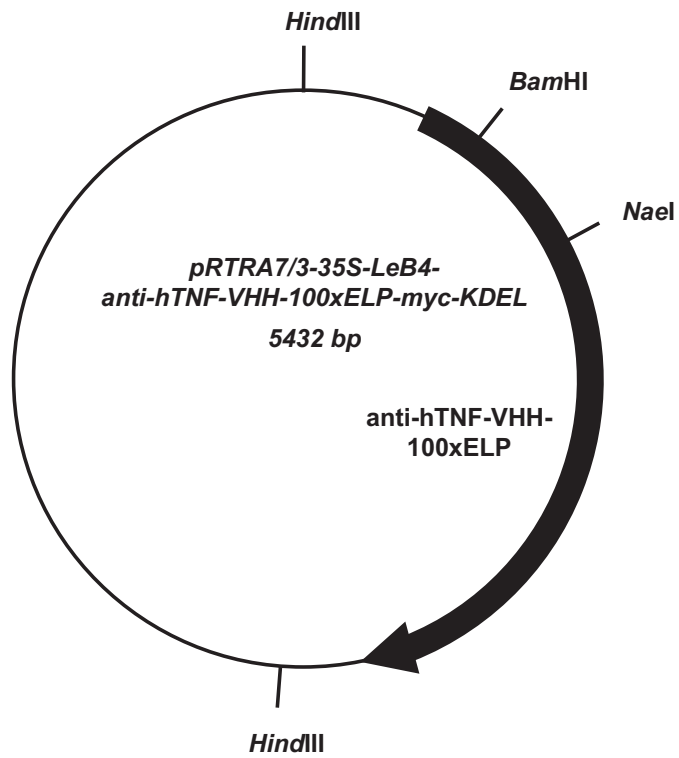
pet23a(+)-pelB-anti-hTNF-VHH-ELP-myc-his



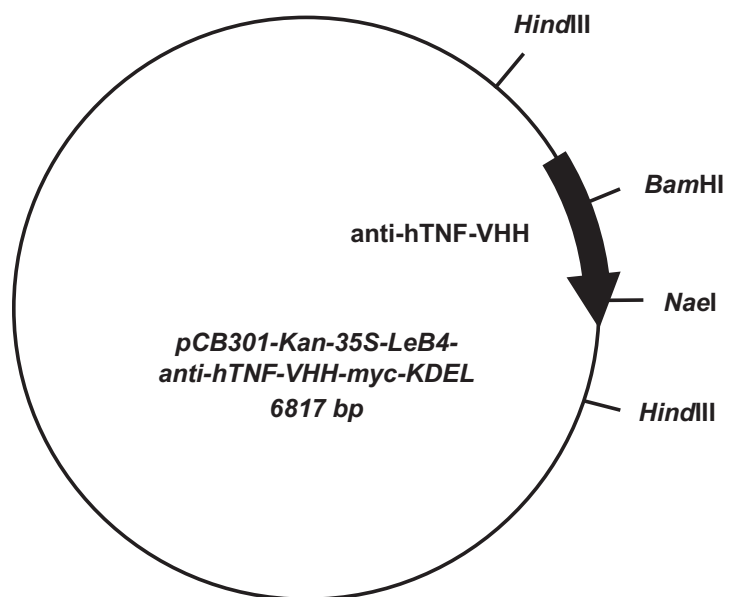
pRTRA7/3-35S-LeB4-anti-hTNF-VHH-myc-KDEL



pRTRA7/3-35S-LeB4-anti-hTNF-VHH-100xELP-myc-KDEL



pCB301-Kan-35S-LeB4-anti-hTNF-VHH-myc-KDEL



pCB301-Kan-35S-LeB4-anti-hTNF-VHH-myc-100xELP-KDEL

