

**Entwicklung wirkstoffproduzierender T-Lymphozyten  
für die zelluläre Immuntherapie**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades des Doktors der Naturwissenschaften  
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes

von

Diplom-Biologin

**Ruth Eggers**

Saarbrücken

2019

Tag des Kolloquiums: 18. Dezember 2019

Dekan: Prof. Dr. Guido Kickelbick

Berichterstatter: Prof. Dr. Manfred J. Schmitt  
Prof. Dr. Markus Hoth

Vorsitz: Prof. Dr. Uli Müller

Akademischer Mitarbeiter: Dr. Sascha Tierling

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>Übersicht / Abstract</b>	<b>1</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>2</b>
1.1 Immuntherapie und adoptive T-Zell-Therapie	2
1.1.1 Krebs-Immuntherapien	2
1.1.2 Adoptive T-Zell-Therapie	3
1.1.3 Antikörper-basierte Krebs-Therapie	4
1.1.4 Verwendung von T-Zellen zum Drug-Delivery	6
1.1.5 Gentechnisch manipulierte T-Zellen in der adoptiven T-Zell-Therapie	7
1.2 Immuntoxine	9
1.2.1 Toxinkomponente PE38	11
1.2.2 Zielkomponente scFv-e23	13
1.2.3 Zielkomponente VEGF <sub>165</sub>	15
1.3 Kombination von adoptiver T-Zell-Therapie mit Immuntoxinen	17
1.4 Ziele und Fragestellung der vorliegenden Arbeit	19
<b>2 Materialien</b>	<b>20</b>
2.1 Organismen	20
2.1.1 Bakterienstamm	20
2.1.2 Humane Zelllinien	20
2.1.3 Primäre, humane Zellkulturen	20
2.2 Plasmide und Oligonukleotide	21
2.2.1 Plasmide für die Klonierung	21
2.2.2 Oligonukleotide	23
2.3 Nährmedien für die Zellkultur	24
2.4 Antikörper	25
2.5 Chemikalien, Enzyme, Kits	27
2.6 Geräte	31
<b>3 Methoden</b>	<b>32</b>
3.1 Molekularbiologische Methoden	32

---

3.1.1 Kultivierung von Bakterien	32
3.1.2 Präparation von chemisch kompetenten Zellen von <i>E. coli</i>	32
3.1.3 Transformation von <i>E. coli</i> XL1-Blue	33
3.1.4 Isolierung von Plasmid-DNA	33
3.1.5 Agarosegelelektrophorese	34
3.1.6 Denaturierende Agarosegelelektrophorese	34
3.1.7 DNA-Gelextraktion und NaAc/EtOH-Fällung	35
3.1.8 Restriktionsenzymatischer Verdau von DNA	36
3.1.9 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	36
3.1.10 DNA-Ligation	37
3.1.11 Primerhybridisierung	38
3.1.12 Gerichtete Mutagenese	38
3.1.13 <i>In vitro</i> -mRNA-Transkription	39
3.2 Methoden der Zellkultur	40
3.2.1 Isolierung von primären, humanen T-Zellen	40
3.2.2 Aktivierung und Kultivierung von primären, humanen T-Zellen	41
3.2.3 Kultivierung von Zelllinien und HUVEC-Zellen	41
3.2.4 Zellzahlbestimmung	42
3.2.5 Kryokulturen von primären Säugerzellen und Säugerzelllinien	42
3.2.6 Elektroporation von T-Zellen	42
3.2.7 Elektroporation von HEK293 Zellen	43
3.2.8 Aufschluss humaner Zellen mittels enzymatischer Lyse	43
3.2.9 Aufschluss humaner Zellen mittels Ultraschall	44
3.3 Zellbiologische Assays	44
3.3.1 Durchflusszytometrie	44
3.3.2 Zellfärbungen für die Durchflusszytometrie	45
3.3.3 Mikroskopie / Fluoreszenzmikroskopie	46
3.3.4 Zellfärbungen für die Fluoreszenzmikroskopie	46
3.3.5 Tube-Formation-Assay	47
3.3.6 WST-1-Assay	47

---

3.4 Biochemische Assays	48
3.4.1 Bradford-Assay	48
3.4.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	48
3.4.3 Western-Analyse und Immunfärbung	50
3.4.4 Enzyme-linked-Immunsorbent-Assay	51
3.4.5 Massenspektrometrie	52
3.5 Statistik	53
<b>4 Ergebnisse</b>	<b>54</b>
4.1 eGFP-Varianten für die Expression in T-Zellen und HEK293-Zellen	54
4.1.1 Konstruktion der Expressionsvektoren für die eGFP-Varianten	54
4.1.2 Transiente Transfektion von T-Zellen mit eGFP-mRNA	56
4.1.2.1 Transfektion von T-Zellen mit SP(i)-eGFP mRNA	56
4.1.2.2 Zeitlicher Verlauf der eGFP-Expression in T-Zellen	60
4.1.2.3 Effizienz der transienten Transfektion in Abhängigkeit vom Aktivierungsstatus der T-Zellen	64
4.1.2.4 Expression und Lokalisation von eGFP in T-Zellen in Abhängigkeit vom ER-Signalpeptid	66
4.1.2.5 Vergleich der eGFP-Expression in T-Zellen mit verschiedenen ER- Signalpeptiden	68
4.1.2.6 Vergleich der eGFP-Expression in CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen und in CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen	70
4.1.3 Transiente Transfektion von HEK293-Zellen mit eGFP-mRNA	72
4.1.3.1 Elektroporationsparameter für die mRNA-Transfektion von HEK293- Zellen	72
4.1.3.2 Lokalisation von eGFP in HEK293-Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie	76
4.2 Immuntoxin-Varianten für die Expression in T-Zellen und HEK293-Zellen	77
4.2.1 Konstruktion der Immuntoxine e23-PE38 und VEGF-PE38	77
4.2.1.1 Aufbau der Immuntoxine	77
4.2.1.2 Klonierung der Immuntoxine VEGF-PE38 und e23-PE38	79
4.2.2 Expression von Immuntoxinen in transient transfizierten T-Zellen	81
4.2.2.1 Abhängigkeit der Immuntoxin-Synthese von der Menge an transfizierter mRNA	81

---

4.2.2.2 Auswirkungen der Immuntoxin-Expression auf die Vitalität der transient transfizierten T-Zellen	83
4.2.3 Das attenuiert Immuntoxin VEGF-PE38D	85
4.2.3.1 Expression von attenuiertem Immuntoxin VEGF-PE38D	85
4.2.3.2 Einfluss der Mutation des aktiven Zentrums von VEGF-PE38 auf die Vitalität der transfizierten T-Zellen	88
4.2.4 Sekretion des Immuntoxins VEGF-PE38D	91
4.2.4.1 Sekretion des Immuntoxins VEGF-PE38D durch T-Zellen und HEK293-Zellen	91
4.2.4.2 Einfluss des ER-Signalpeptids von IFN $\gamma$ auf die Expression von Immuntoxin e23-PE38 in T-Zellen	95
4.2.4.3 Posttranslationale Prozessierung von VEGF-PE38D	97
4.2.5 Zytotoxizität von Immuntoxin exprimierenden T-Zellen	100
4.2.5.1 Zytotoxischer Effekt von VEGF-PE38 sekretierenden T-Zellen auf HUVEC-Zellen	100
4.2.5.2 VEGF-PE38 exprimierende T-Zellen im Tube-Formation-Assay	102
4.2.5.3 Zytotoxischer Effekt von e23-PE38 exprimierenden T-Zellen gegenüber SK-OV-3-Zellen	107
4.2.5.4 HEA125xOKT3 vermittelte Toxizität von e23-PE38 exprimierenden T-Zellen gegenüber SK-OV-3 Zellen	112
<b>5 Diskussion</b>	<b>115</b>
<b>6 Literaturverzeichnis</b>	<b>126</b>
<b>7 Veröffentlichungen</b>	<b>133</b>
<b>8 Danksagung</b>	<b>134</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Amp	Ampicillin
BSA	Bovines Serumalbumin
bsAk	Bispezifischer Antikörper
CD	Unterscheidungsgruppe ( <i>cluster of differentiation</i> )
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid ( <i>carbon dioxide</i> )
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethyldicarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	Verbessertes ( <i>enhanced</i> ) Grün Fluoreszierendes Protein
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EpCAM	Epithelial cell adhesion molecule
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FACS	Fluorescence activated cell scanning
FBS	Fetales Kälberserum ( <i>fetal bovine serum</i> )
FDA	Amerikanischen Gesundheitsbehörde ( <i>food and drug administration</i> )
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
h	Stunde ( <i>hour</i> )
HCL	Salzsäure ( <i>hydrochloric acid</i> )
HRP	Meerrettichperoxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
HUVEC	Humane Venöse Nabelschnur-Endothelzellen ( <i>human umbilical endothelial vein cells</i> )
IC <sub>50</sub>	Mittlere inhibitorische Konzentration ( <i>half maximal inhibitory concentration</i> )
IF	Immunfluoreszenz
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
k	Kilo
l	Liter
m	Milli
M	Molar; mol/l
MALDI	Matrix-Assistierte Laser-Desorption-Ionisierung
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>major histocompatibility complex</i> )
min	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
OD <sub>x</sub>	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm

---

PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PEA	<i>Pseudomonas</i> Exotoxin A
PE38	Verkürzte Form von <i>Pseudomonas</i> Exotoxin A
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
RFU	Relative Fluoreszenzeinheit ( <i>relative fluorescence unit</i> )
pH	potential hydrogenii
PBMC	mononukleäre Zelle des peripheren Blutes ( <i>peripheral blood mononuclear cell</i> )
PI	Propidiumiodid
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
sek	Sekunde
scFv	single chain variable fragment
s.d.	Standardabweichung ( <i>standard deviation</i> )
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SP	Signalpeptid
TBS	Salzlösung ( <i>Tris-buffered saline</i> )
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TIL	Tumor infiltrierende Lymphozyten
TGF- $\beta$ -2	Transformierender Wachstumsfaktor beta 2 ( <i>transforming growth factor beta 2</i> )
ToF	Flugzeitanalyse ( <i>time of flight</i> )
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit ( <i>unit</i> )
ÜN	über Nacht
UV	Ultra Violett
V	Volt
VEGF	Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor ( <i>vascular endothelial growth factor</i> )
WST	wasserlösliches Tetrazolium ( <i>water soluble tetrazolium</i> )
w/v	Gewicht/Volumen ( <i>weight/volume</i> )

## Übersicht / Abstract

Bei der Behandlung von Krebserkrankungen werden heute vielfach Immuntherapien eingesetzt, bei denen körpereigene Mechanismen des Immunsystems genutzt werden, um den Tumor zu bekämpfen. In der vorliegenden Arbeit sollten aktivierte, humane, primäre T-Zellen als Carrier für einen mRNA-kodierten Anti-Tumor-Wirkstoff untersucht werden. Als Wirkstoff wurden Immuntoxine gewählt, die mittels mRNA kodiert und mittels Elektroporation in die Zellen eingebracht wurden. Immuntoxine eignen sich hierfür, weil sie aufgrund ihrer hohen Toxizität in geringen Mengen wirksam und aufgrund ihrer Zielkomponente hoch spezifisch sind. Sowohl T-Zellen, als auch HEK293-Zellen konnten erfolgreich, ohne Beeinträchtigung ihrer Vitalität, mit mRNA-transfiziert werden wie mit eGFP als Modellprotein gezeigt werden konnte. Für die beiden ausgewählten Immuntoxine VEGF-PE38 und e23-PE38 konnte eine Expression und Sekretion durch T-Zellen und HEK293-Zellen gezeigt werden. Die Prozessierung und Sekretion des Immuntoxins VEGF-PE38D konnte mittels MALDI-ToF-Analyse weiter untersucht und bestätigt werden. In einem *in vitro*-Toxizitäts-Assay konnte eine durch den bispezifischen Antikörper vermittelte, zytotoxische Aktivität der Immuntoxin exprimierenden T-Zellen gegenüber Adenokarzinomzellen gezeigt werden.

Today's immunotherapies are often applied for the treatment of cancer in which the body's own immune system is used to fight the cancer. Within the present study, activated, human, peripheral T cells were analyzed as carriers for mRNA encoded anti-tumor agents. Immunotoxins were chosen as anti-tumor agents and the immunotoxin-encoding mRNA was introduced into the cells by electroporation. Immunotoxins are suitable for a mRNA based therapy because their high toxicity results in a high efficiency and because their targeting domain generates a high specificity. T cells as well as HEK293 cells were successfully transfected with mRNA without impairment of their viability as demonstrated using eGFP as model protein. Expression and secretion by T cells and HEK293 cells could be shown for the two selected immunotoxins VEGF-PE38 and e23-PE38. Processing and secretion of the immunotoxin VEGF-PE38D was further investigated and confirmed by MALDI-ToF-analysis. In an *in vitro* cytotoxicity assay, a bsAb-administered cytotoxic activity of the immunotoxin expressing T cells towards adenocarcinoma cells was demonstrated.

# 1 Einleitung

## 1.1 Immuntherapie und adoptive T-Zell-Therapie

### 1.1.1 Krebs-Immuntherapien

Als Krebs oder auch Malignom wird neoplastisches Gewebe bezeichnet, das sich unkontrolliert teilt und ausbreitet. Krebs wird als bösartig bezeichnet, wenn durch Metastasierung andere Gewebe und Organe in ihrer Funktion beeinträchtigt und auch zerstört werden. In Europa erkrankt heute im Schnitt jeder dritte Mensch im Laufe seines Lebens an Krebs. Trotz verbesserter Krebstherapien und dadurch steigender Heilungserfolge liegt die Fünf-Jahres-Überlebensrate in Deutschland bei Frauen bei 66 % und bei Männern bei 61 % (Bericht Krebsgeschehen 2016). Die Entwicklung und Verbesserung von Krebstherapien ist deshalb ein wichtiges Forschungsziel der Onkologie. Klassische Krebstherapien wie die operative Entfernung des Tumorgewebes, die Anwendung von ionisierender Strahlung bei der Radiotherapie oder die Gabe von Zytostatika bei der Chemotherapie zählen nach wie vor zu den am meisten verbreiteten und effektivsten Methoden. Bei diesen Therapiemethoden ist allerdings von Nachteil, dass sie stark invasiv sind und dadurch zu starken Nebenwirkungen führen können. Die Therapien stellen also oft eine starke Belastung für den Patienten dar und wirken unter anderem dadurch der Genesung entgegen. Deshalb wird weltweit an der Entwicklung von alternativen Krebstherapien geforscht, bei denen der Krebs mit schonenden, gezielten, minimalinvasiven, körpereigenen Mechanismen bekämpft wird. Die Immuntherapie stellt dabei ein vielversprechendes und vielseitiges Forschungsgebiet dar. Das Prinzip der Immuntherapie basiert darauf, den Krebs zu bekämpfen, indem körpereigene Mechanismen des Immunsystems genutzt werden. Dabei wird die Immunantwort modifiziert, sie kann durch die Behandlung verstärkt, unterdrückt oder erst ausgelöst werden, was über verschiedene Ansätze, wie die Aktivierung, Expansion und Modifikation von Immunzellen, den Einsatz von spezifischen Antikörpern oder die Gabe von Zytokinen oder Immuntoxinen erreicht werden kann.

Wechselwirkungen zwischen dem Immunsystem und dem Krebs sind vielfältig, unter anderem da das Immunsystem das Tumorwachstum sowohl hemmen, als auch fördern kann. Diese doppelte Rolle des Immunsystems für die Entwicklung des Tumors wird unter dem Begriff „Krebs-Immunediting“ diskutiert und beschrieben (O'Donnell *et al.*, 2018). Die Bekämpfung des Krebses durch das Immunsystem erfolgt unter anderem dadurch, dass Zellen des Immunsystems die Krebszellen direkt zerstören. Die Erkennung der Krebszellen durch die Immunzellen erfolgt über krebsspezifische Antigene, die von den

Tumorzellen präsentiert werden. Bei krebsspezifischen Antigenen handelt es sich um Produkte von mutierten zelleigenen Genen, von aberrant exprimierten, normalen Genen oder von Genen, die für virale Proteine kodieren (Schreiber *et al.*, 2011). Diese Antigene werden auch als Tumormarker bezeichnet und werden sowohl im Rahmen der Diagnostik, als auch der Therapie als Ziel verwendet. Dadurch, dass Krebsmedikamente gezielt gegen Krebszellen gerichtet sind, können die Nebenwirkungen drastisch reduziert werden. Dieses Targeting kann durch den Einsatz von Antikörpern, Antikörperfragmenten oder Liganden der Tumormarker erreicht werden. Entsprechend des Antigens können dadurch Mechanismen in der Tumorzelle verstärkt oder gehemmt werden oder die Aufnahme eines toxischen Moleküls über Endozytose kann vermittelt werden.

Tumorzellen haben verschiedene Mechanismen entwickelt, der Erkennung und Bekämpfung durch das Immunsystem zu entgehen. Dazu gehören die verminderte Antigen-Prozessierung und Antigen-Präsentation der Zelle, wodurch die Tumorzellen nicht mehr als solche vom Immunsystem erkannt werden. Der Tumor kann Suppressor-Immunzellen wie regulatorische T-Zellen oder tumorassoziierte Makrophagen rekrutieren, die bei soliden Tumoren unter anderem die Proliferation und die Metastasierung des Tumors fördern. Zudem kann der Tumor immunsuppressive Zytokine wie IL-10 freisetzen oder die Aktivität von TILs hemmen (Yang, 2015). Konzepte der Immuntherapie basieren deshalb oft auf der Reaktivierung oder Verstärkung des Immunsystems.

### 1.1.2 Adoptive T-Zell-Therapie

Bei der adoptiven T-Zell-Therapie wird die spezifische zytotoxische Aktivität von T-Zellen gegenüber Tumorzellen genutzt, um den Tumor zu bekämpfen. T-Zellen gehören zu den weißen Blutzellen, die für die Erkennung von Fremdstoffen wie Bakterien und Viren aber auch Tumorzellen zuständig sind. Weiße Blutzellen liegen im Knochenmark, in den lymphatischen Organen, vor allem aber im Blut vor. T-Zellen sind gemeinsam mit den B-Zellen für die adaptive Immunantwort zuständig. Werden T-Zellen Antigene über den MHC I- und MHC II-Komplex Antigenpräsentierender Zellen dargeboten, so erkennen sie diese und werden dadurch aktiviert. Dadurch differenzieren sie in verschiedene T-Zell-Subtypen aus, unter anderem den CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, den CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und den regulatorischen T-Zellen (Weigelin *et al.*, 2011). Krebszellen können über krebsspezifische Antigene, die sie über MHC präsentieren, vom Immunsystem als krank erkannt werden. T-Zellen, denen krebsspezifische Antigene präsentiert werden, reifen zu tumorspezifischen T-Zellen aus. Migrieren T-Zellen durch Gewebe und haben dabei Kontakt mit Krebszellen, die MHC-vermittelt krebsspezifische Antigene präsentieren, so können sie über die Ausschüttung

von Perforin und Granzym B oder vermittelt durch den Fas-Liganden Apoptose in der Zielzelle auslösen (Weigelin *et al.*, 2011). Das Töten von Krebszellen durch CD8<sup>+</sup>-T-Zellen dauert einige Minuten bis wenige Stunden, wobei eine T-Zelle nacheinander mehrere Krebszellen töten kann (Breart *et al.*, 2008).

Für die Bekämpfung von Krebs mittels adoptiver T-Zell-Therapie können zum Beispiel Tumor-infiltrierende Lymphozyten (TILs) eingesetzt werden. Dies sind Lymphozyten, vor allem T-Zellen, die in den Tumor einwandern. Sie können dem Tumor operativ entnommen und *ex vivo* unter IL-2-Zugabe expandiert werden. Die so gewonnenen T-Zellen zeigen zu 80 % eine autologe Tumor-Reaktivität und können für eine Tumortherapie verwendet werden (Dudley *et al.*, 2010). Ende der 1990er Jahre konnten so erstmals erfolgreich adoptiv transferierte T-Zellen zur Bekämpfung von Melanomen und renalem Zellkarzinom eingesetzt werden (Atkins, 1998; von Rosenberg *et al.*, 1998). TILs werden heute in klinischen Versuchen der Phase zwei unter anderem gegen Melanome, kolorektale Tumore oder Zervixkarzinome eingesetzt. Ein Nachteil der Behandlung mit TILs ist ihre aufwändige und nicht in jedem Fall erfolgreiche Gewinnung aus dem Tumor, weshalb auch periphere T-Zellen für die Bekämpfung von Krebs eingesetzt werden. Periphere T-Zellen des Patienten können *ex vivo* krebsspezifisch aktiviert werden, so dass sie den Krebs gezielter und effektiver bekämpfen können.

In dem in dieser Arbeit vorgestellten Therapie-Konzept sollen periphere T-Zellen verwendet werden, die nach einer *ex vivo*-Modifikation dem Patienten reinjiziert werden und mit verstärkter oder zusätzlicher zytotoxischer Funktion gegenüber den Tumorzellen für die Krebstherapie eingesetzt werden sollen.

### 1.1.3 Antikörper-basierte Krebs-Therapie

Bei der antikörperbasierten Krebs-Therapie wird die Eigenschaft von Krebszellen genutzt, dass diese sich durch die Präsentation von Tumormarkern auf der Zelloberfläche von gesundem Gewebe unterscheiden. Tumormarker sind Produkte von mutierten zelleigenen Genen, von aberrant exprimierten normalen Genen oder von Genen, die für virale Proteine kodieren (Schreiber *et al.*, 2011). Das Abtöten von Krebszellen mit monoklonalen Antikörpern kann über verschiedene Mechanismen ablaufen. Zum Beispiel kann das Blockieren eines Rezeptors zum Absterben der Krebszelle führen oder der Antikörper kann einen immunvermittelten Zelltötungsmechanismus initiieren oder verstärken. Ebenso können Antikörper gegen die Tumervaskulatur oder das Stroma gerichtet sein; indem sie diese schädigen, wird der Tumor indirekt bekämpft (Scott *et al.*, 2012). Der Einsatz von monoklonalen Antikörpern, die hoch spezifisch und hoch effizient

binden, führt zu einer gerichteten Therapie, wodurch Nebenwirkungen deutlich verringert werden können. Therapeutische monoklonale Antikörper, die als Krebstherapeutikum entwickelt wurden, sind zum Beispiel das IM-2C6, das gegen den auf der Neovaskulatur von Tumoren präsenten VEGF-Rezeptor gerichtet ist. Der monoklonale Antikörper Pertuzumab, der gegen den epidermalen Wachstumsfaktor Her2/neu gerichtet ist, wird zur Behandlung von Brust-, Darm-, Lungen-, Eierstock- und Prostatakrebs eingesetzt (Scott *et al.*, 2012). Im Jahr 2013 wurde Trastuzumab-Emtansin (Kadcyla®) durch die Europäische Arzneimittelbehörde zugelassen; ein Her2/neu-basiertes Antikörper-Wirkstoff-Konjugat, zusammengesetzt aus dem Bindeepitop von Trastuzumab und dem Mikrotubuli-Inhibitor DM1 (Verma *et al.*, 2012). Es wird intravenös verabreicht und bei Her2/neu-positivem Brustkrebs, metastasierendem Magenkarzinom und Karzinom des gastroösophagenalen Übergangs eingesetzt (Bang *et al.*, 2010).

Antikörper können auch als sogenannte Checkpointinhibitoren für eine Krebstherapie eingesetzt werden, um inhibierende Immunregulatoren zu blockieren. Das Membranprotein CTLA-4, das von T-Zellen auf der Zelloberfläche präsentiert wird, ist für eine Hemmung der Immunantwort zuständig. Mit dem monoklonalen Antikörper Ipilimumab kann das CTLA-4 gehemmt und dadurch die Immunantwort der T-Zellen verstärkt werden. Der Antikörper Ipilimumab wurde im Jahr 2011 von der FDA für die Behandlung von metastasierenden malignen Melanomen zugelassen (Lipson & Drake, 2011). Die Antikörper Nivolumab und Pembrolizumab funktionieren nach einem ähnlichen Prinzip. Das PD-1, ein Oberflächenprotein auf T-Zellen, ist ebenfalls für die Hemmung der Immunantwort zuständig; wird PD-1 durch die therapeutischen Antikörper blockiert, so wird das Immunsystem aktiviert (Deeks, 2014; Pardoll, 2016).

Bispezifische Antikörper (bsAk), Immunkonjugate aus zwei verschiedenen Antikörpern, werden unter anderem in der Tumorthherapie eingesetzt. Werden zum Beispiel ein Antikörper, der gegen einen Tumormarker und ein Antikörper, der gegen CD3 von T-Zellen gerichtet ist, konjugiert, so können T-Zellen spezifisch gegen Zellen mit dem entsprechenden Tumormarker aktiviert werden. *In vitro*-Versuche mit bsAk haben gezeigt, dass nicht aktivierte, Tumor-assoziierte Lymphozyten in der Lage sind, vermittelt durch den bsAk HEA125xOKT3 autologe Tumor-Zellen zu lysieren (Strauß *et al.*, 1999). Ein bsAk, der für die Behandlung der akuten lymphatischen Leukämie eingesetzt wird, ist das Blinatumomab, das gegen den CD3-Rezeptor von T-Zellen und gegen den CD19-Rezeptor von B-Zellen gerichtet ist (Topp *et al.*, 2011). Dieser wurde 2015 von der Europäischen Arzneimittelbehörde zugelassen. Auch trispezifische Antikörper wurden entwickelt, diese binden zusätzlich über den Fc-Teil an akzessorische Zellen wie Makrophagen oder natürliche Killerzellen. Ein Beispiel ist das Catumaxomab, ein trispezifische Antikörper, der gegen EpCAM und den CD3-Rezeptor von T-Zellen gerichtet ist. Er wurde von der Europäischen

Arzneimittelbehörde 2009 für die Behandlung von bösartiger Bauchwassersucht zugelassen (Ruf *et al.*, 2007).

Der in der vorliegenden Arbeit verwendete bsAk HEA125xOKT3 ist ein circa 80 kDa großes Quadrom, das durch die Fusion der zwei Hybridome HEA125 und OKT3 mit der Hybridom-Technik hergestellt wurde. OKT3 ist ein muriner monoklonaler IgG<sub>2a</sub>-Antikörper, der gegen den CD3-Rezeptor gerichtet ist. Durch die Bindung der  $\epsilon$ -Kette des T-Zell-Rezeptor/CD3-Komplexes durch den Antikörper wird die T-Zelle aktiviert (Strauß *et al.*, 1999). HEA125 ist ein Antikörper, der gegen das epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM gerichtet ist. Dieses ist ein 40 kDa großes Oberflächenprotein, das in Epithelien zum Beispiel Zell-Zell-Kontakte vermittelt. Das Membranprotein wird auf den meisten epithelialen Körperzellen präsentiert und auf den Tumoren, die aus diesen entstehen (Deppe, 2009). Über EpCAM wird eine spezifische Bindung der T-Zellen an die Krebszellen vermittelt.

#### **1.1.4 Verwendung von T-Zellen zum Drug-Delivery**

Für die Behandlung von Krebserkrankungen stellt die zellbasierte Therapie einen innovativen Ansatz dar, der sich von der systemischen Gabe von Medikamenten stark unterscheidet. Am Ort des Tumors kann hierbei eine Medikamentenfreisetzung induziert werden, die im Vergleich zu der systemischen Applikation höher konzentriert ist und über einen längeren Zeitraum abläuft und deshalb andere Parameter der Freisetzungskinetik bietet (Batrakova *et al.*, 2016). Die Verwendung von Immunzellen bietet die Möglichkeit des gezielten Transports an den Tumor und zusätzlich sind diese Zellen in der Lage, eine direkte Zell-zu-Zell-Übertragung des Wirkstoffes, zum Beispiel über sekretorische Vesikel, zu realisieren. Dieser gezielte Medikamententransport und die verlängerte Applikationsdauer vermindern die toxischen Effekte des Medikamentes gegenüber den umgebenden Zellen und dem umgebenden Gewebe stark (Batrakova *et al.*, 2016). Die Verwendung von patienteneigenen Immunzellen bietet den Vorteil, dass die Zellen nicht vom Immunsystem des Körpers abgestoßen werden und nach der Behandlung rückstandslos abgebaut werden können. Das ist ein Vorteil gegenüber anderen Delivery-Plattformen wie Lipiden oder Nanopartikeln, die auch zum Drug-Delivery eingesetzt werden. Zusätzlich stellen Zellen einen effektiven Schutz für die zu transportierenden Medikamente vor dem körpereigenen Abwehrsystem dar, da diese im Inneren der Zellen eingeschlossen werden. Außerdem sind beim Einsatz von körpereigenen Zellen kaum Immunreaktionen oder toxische Effekte zu erwarten; aufwändige Zulassungsverfahren entfallen somit.

Vor allem T-Zellen eignen sich für das Drug-Delivery, da sie selbständig zum Tumor wandern können und eine intrinsische Tumoraktivität haben. Zudem stellt die Möglichkeit, T-Zellen *ex vivo* stark zu vermehren, einen Vorteil der T-Zell-Therapie dar. Allerdings ist das T-Zell-Homing zum Tumor oft ineffektiv, da dieser strukturelle und biologische Barrieren aufbaut, eine Diskrepanz zwischen den vom Tumor freigesetzten Chemokinen und den Rezeptoren der T-Zellen bestehen kann oder eine Hypoxie-induzierte Umorganisation der Tumervaskulatur das T-Zell-Homing behindert (Vignali & Kallikourdis, 2017). Um dem entgegen zu wirken, werden T-Zellen häufig zusätzlich *ex vivo* manipuliert, indem sie zum Beispiel spezifisch gegen Tumormarker aktiviert werden oder ihre zytotoxische Aktivität *ex vivo* verstärkt wird.

T-Zellen können zum Beispiel als Carrier für Medikament tragende Partikel eingesetzt werden, die dann am Wirkort freigesetzt werden. In einer vorherigen Studie konnte gezeigt werden, dass primäre T-Zellen magnetische Eisennanopartikel, die mit Carboxymethyldextran ummantelt und mit Doxorubicin beladen waren, aufnahmen. Allerdings konnte das Doxorubicin mittels Fluoreszenzmikroskopie im Zellkern der T-Zellen nachgewiesen werden, was den toxischen Effekt der Doxorubicin-Nanopartikel auf die T-Zellen erklären kann. Es konnte also davon ausgegangen werden, dass das Doxorubicin schon in den T-Zellen freigesetzt wurde (Prinz *et al.*, 2010). Die Wirkung des Krebsmedikamentes gegenüber der Carrier-Zelle stellt ein generelles Problem bei der Verwendung von Immunzellen als Drug-Carrier dar. Bei der Entwicklung von Therapien muss deshalb darauf geachtet werden, dass die Zellen effizient beladen werden, dass das Medikament am Tumor zuverlässig freigesetzt wird und vor allem, dass das Medikament weder die Migration noch das Überleben der T-Zelle beeinträchtigt (Batrakova *et al.*, 2011).

### **1.1.5 Gentechnisch manipulierte T-Zellen in der adoptiven T-Zell-Therapie**

Die Gentechnik bietet vielseitige Möglichkeiten, T-Zellen für den Einsatz in der Krebstherapie zu manipulieren. Mittels gentechnischer Modifizierung von T-Zellen ist es möglich, diesen spezifische Eigenschaften für die Bekämpfung des Tumors zu verleihen oder intrinsische Mechanismen zu verstärken, wodurch ihre zytotoxische Aktivität gegenüber Krebszellen verstärkt werden kann.

Eine inzwischen zugelassene Krebs-Therapie, bei der gentechnisch veränderte T-Zellen eingesetzt werden, ist die CAR-T-Zell-Therapie. Im Rahmen dieser Therapie werden autologe T-Zellen transduziert, so dass sie chimäre Antigen-Rezeptoren (CARs), die gegen das krebsspezifische Antigene CD19 gerichtet sind, auf der Zelloberfläche

präsentieren (Wang *et al.*, 2012) Das B-Lymphozyten-Antigen CD19 wird bei den meisten B-Zell-Lymphomen stark überexprimiert. CARs sind aus der variablen Region eines Tumorspezifischen Antikörpers und einer intrazellulären Signaldomäne aufgebaut, die in der Lage ist die T-Zellen zu aktivieren. Das ist üblicherweise ein extrazelluläres Single chain variable fragment scFv-Fragment eines monoklonalen Antikörpers und eine intrazelluläre CD3 zeta-Kette „in tandem“ mit einer kostimulierenden Signaldomäne von CD28 (Srivastava & Riddell, 2015). Ein weit verbreiteter immun-evasiver-Mechanismus von Tumorzellen ist die Herabregulation der Expression des MHC-Klasse I-Rezeptors (Beatty & Gladney, 2015). Mit der CAR-T-Zell-Therapie steht eine Therapie zur Verfügung, die vom MHC-Komplex unabhängig ist und die es ermöglicht, zytotoxische T-Zellen mit einer Spezifität für nahezu alle Antigene zu erzeugen. Das CD19 eignet sich besonders als Antigen, weil es in B-Zell-Tumoren häufig und auf einem hohen Level exprimiert wird. Außerdem ist der Verlust aller normalen B-Zellen bei gleichzeitig angewandeter Immunglobulin-Therapie für den Patienten tolerierbar (Porter *et al.*, 2011). Die gegen CD19 gerichteten CAR-T-Zellen wurden im Jahr 2017 als erste Gentherapie zur Behandlung von akuter lymphatischer Leukämie von der FDA zugelassen. Die Therapie wird angewandt gegen Tumorerkrankungen wie der chronischen lymphozytischen Leukämie, der akuten lymphoblastischen Leukämie oder der refraktorischen B-Zell akuten lymphoblastischen Leukämie. Bei den genannten Formen der Leukämie wurde eine komplette Remission von 70 % bis 90 % beobachtet (Lim & June, 2018). Einen Nachteil stellen Nebenwirkung wie das Zytokin-Freisetzungssyndrom dar, das bei 46 % der Patienten nach einer CAR-T-Zell-Therapie gegen refraktorisches akute lymphoblastische Leukämie beobachtet wurde (Fitzgerald *et al.*, 2017).

Eine weitere Möglichkeit der gentechnischen Modifikation von T-Zellen für die Krebstherapie stellt die Induktion einer Expression von krebsspezifischen Toxinen dar. Zum Beispiel kann im Rahmen einer adoptiven T-Zell-Therapie als zusätzlicher Faktor ein Immuntoxin durch die T-Zellen exprimiert und sekretiert werden. Dies wurde erstmals mit einem gegen das Onkoprotein Her2/neu gerichteten Fusionsprotein getestet, das aus dem scFv-Fragment des Antikörpers e23 und einer verkürzten Version von *Pseudomonas* Exotoxin A (PEA) zusammen gesetzt war. Für Lymphozyten, die mit einem Plasmid transduziert waren, das für dieses Immuntoxin kodierte, konnte *in vitro* eine starke und selektive Zytotoxizität gegenüber Her2/neu exprimierenden Tumorzellen gezeigt werden (Chen *et al.*, 1997).

Allogene, Antigen-spezifische T-Zell-Klone konnten in einer anderen Studie erfolgreich als Vektoren für den Transport eines IL4-basierten Immunttoxins eingesetzt werden. In *in vitro*-Versuchen konnte nur ein temporär signifikant geschädigtes Wachstum der Zelllinie C1498 beobachtet, aber mittels *in vivo* -Studien ein Antitumoreffekt gezeigt

werden. In Mausmodellen konnte eine Hemmung des Tumorwachstums bei wiederholter Gabe von transduzierten T15-T-Zellen nachgewiesen werden. Für die alleinige Gabe des aus Bakterien isolierten Immuntoxins konnte in dieser Studie keine Wirkung gezeigt werden, was zeigt, dass der Einsatz der T-Zellen als Delivery-Plattform Vorteile bietet (Vallera *et al.*, 2000). Auch für T-Zellen, die ein gegen die Neovaskulatur gerichtetes Immuntoxin exprimierten, konnte eine Hemmung des Tumorwachstums gezeigt werden. Für die Antigen-spezifische zytotoxische T-Zelllinie T15, transfiziert mit einem retroviralen Vektor, der für ein aus VEGF und verkürztem PEA zusammengesetztes Immuntoxin kodierte, konnte eine spezifische Wirkung gegen HUVEC-Zellen und eine Reduktion des Tumorummens im Mausmodell gezeigt werden (Jin *et al.*, 2002). In einer anderen Studie konnten T-Zellen gentechnisch so modifiziert werden, so dass sie einen rekombinanten T-Zell-Rezeptor exprimierten, der Sequenzen des VEGF beinhaltet. Für diese T-Zellen konnte *in vitro* eine spezifische zytotoxische Aktivität gegenüber VEGFR-2-positiven Zellen gezeigt werden (Niederman *et al.*, 2002). Dieser Ansatz ist vergleichbar mit dem der CAR-T-Zellen, welcher nach einem adoptivem Transfer zu einer deutlichen Reduktion des Tumorwachstums führte.

Diese Studien zeigen, dass sich T-Zellen grundsätzlich als Expressionsvektoren und Delivery-Plattform für Immuntoxine eignen. Ein Vorteil dieser Therapieansätze ist die Reduktion der Nebenwirkungen der hoch toxischen Immuntoxine gegenüber benachbarten Zellen und Geweben. Der Einsatz von Immuntoxin-exprimierenden Immunzellen bietet außerdem den Vorteil, dass keine oder nur eine sehr geringe Immunantwort auf den Vektor zu erwarten ist (Pereboeva & Curiel, 2004). Das Immuntoxin wird als genetische Information durch die Zelle zum Tumor transportiert und dort von der Zelle exprimiert, wodurch eine Immunantwort ebenfalls stark reduziert werden kann. Von Vorteil ist außerdem, dass die Verwendung von humanen Zellen für die Expression eines therapeutischen Proteins in Proteinen resultiert, die in einer biologisch aktiven Form hergestellt werden und so an den Wirkort gelangen.

## 1.2 Immuntoxine

Immuntoxine sind chimäre, rekombinante Proteine, die aus einer Zielkomponente und einer Toxinkomponente zusammengesetzt sind, die chemisch oder gentechnisch miteinander verbunden wurden. Diese künstlich hergestellten Proteine werden zum Beispiel bei der Behandlung von Krebserkrankungen eingesetzt; sie haben eine hohe Spezifität, da die Toxinkomponente über die Zielkomponente die Tumorzelle direkt bindet. Als Zielkomponente werden Moleküle verwendet, die die Zielzelle hoch spezifisch binden,

dies können Antikörper, Antikörperfragmente, Polypeptide oder Liganden für einen Tumormarker (Fitzgerald *et al.*, 2011). Da Tumormarker oft spezifisch für den jeweiligen Tumor sind, eignen sie sich als Ziel für therapeutische Immuntoxine. Als Toxinkomponente eines Immuntoxins werden häufig bakterielle oder pflanzliche Toxine eingesetzt, aber ebenso können Apoptose induzierende Proteine, Radionukleotide, Enzyme oder Zytokine verwendet werden (Baskar & Muthusamy, 2013). Aufgrund der gezielten Applikation können hoch toxische Toxinkomponenten eingesetzt werden, was den Vorteil bietet, dass geringere Mengen des Medikamentes verabreicht werden müssen. Der Schwellenwert am Wirkort wird früher erreicht, wodurch ein hoher systemischer Wert vermieden werden kann und das Risiko möglicher Nebenwirkungen gesenkt wird (Baskar & Muthusamy, 2013). Beispiele für bakterielle Toxine, die für die Konstruktion von Immuntoxinen eingesetzt werden, sind das PEA von *Pseudomonas aeruginosa*, das Cholera-Toxin von *Vibrio cholerae* und das Diphtherie-Toxin aus *Corynebacterium diphtheriae*. Die pflanzlichen Toxine Ricin aus *Ricinus communis* und das Gelonin aus *Gelonium multiflorum* konnten ebenfalls erfolgreich für die Konstruktion von Immuntoxinen eingesetzt werden (Wolf & Elsässer-Beile, 2009; Baskar & Muthusamy, 2013).

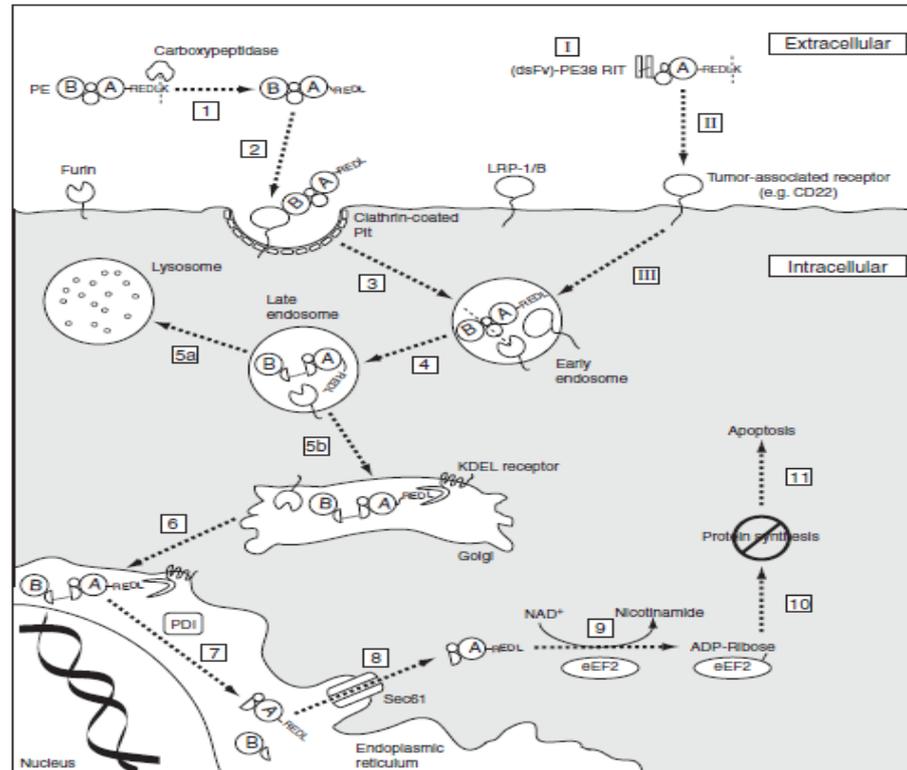
In der ersten Generation von antikörperbasierten Immuntoxinen wurden vollständige Antikörper chemisch mit einem nativen Toxin konjugiert. Nachteile dieser Konjugate waren ihre aufgrund der noch vorhandenen originalen Zieldomäne des Toxins geringe Spezifität, ihre unzureichende Stabilität, ihr heterogener Aufbau und ihre Größe von mehr als 200 kDa, die zu einer verminderten Gewebedurchlässigkeit führte. Um die therapeutischen Eigenschaften von Immuntoxinen zu verbessern, gibt es verschiedene Möglichkeiten. Die meist universelle Zielbindedomäne der Toxinkomponente kann entfernt werden, so dass das Targeting nur über den konjugierten Antikörper abläuft, der hochspezifisch gegen einen Tumormarker gerichtet ist. Um die Gesamtgröße zu minimieren, können nicht essentielle Teile der Komponenten entfernt werden. Dies können weiter nicht essentielle Fragmente des Toxins sein, aber vor allem kann der Antikörper auf sein Antigen-bindendes Fragment reduziert werden; zum Beispiel kann dies das scFv-Fragment eines monoklonalen Antikörpers sein (Pastan, 2007).

Die rekombinante Gentechnik hat es ermöglicht, monoklonale Antikörper und andere Zielkomponenten mit Protein-basierten Toxinen zu Fusionsproteinen zusammen zu fügen. Das Immuntoxin Trastuzumab Emtansine ist ein Antikörper-Medikamenten-Konjugat aus dem monoklonalen Antikörper Trastuzumab und dem Mitosehemmer DM1. Es wurde im Jahr 2013 von der FDA für die Behandlung von Her2-positivem fortgeschrittenem Brustkrebs zugelassen (Verma *et al.*, 2012). Das Immuntoxin DAB389IL2 wird zur Behandlung von chronischer lymphatischer Leukämie eingesetzt, das als Diphtherietoxin-

basiertes Immuntoxin gegen das auf den erkrankten T-Zellen überexprimierte CD25 gerichtet ist (Frankel *et al.*, 2003).

### 1.2.1 Toxinkomponente PE38

Als Toxinkomponente für die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Immuntoxine wurde ein PEA-basiertes Toxin verwendet. Dies ist ein Toxin des gramnegativen, oxidasepositiven, stäbchenförmigen Bakteriums *Pseudomonas aeruginosa*, das als ein weit verbreiteter Boden- und Wasserkeim aufgrund seiner hohen Toxizität häufig für Lebensmittelvergiftungen verantwortlich ist und als Krankenhauskeim identifiziert wird. Das PEA gehört zu einer Gruppe bakterieller Toxine, den ADP-Ribosyltransferasen, zu denen des Weiteren das Diphtherie-Toxin und das Cholera-Toxin gehören. Die toxische Wirkung der ADP-Ribosyltransferasen beruht darauf, dass sie durch eine ADP-Ribosylierung des Elongationsfaktors-2 die Proteinbiosynthese hemmen. Das PEA ist ein zusammenhängendes Polypeptid mit einer Gesamtmasse von 66,5 kDa, das in drei Domänen unterteilt ist. Domäne I, die Zieldomäne, wird von den Domänen Ia (AS 1 - AS 252) und Ib (AS 365 - 404) gebildet, die gemeinsam die Bindung an die Zielzelle vermitteln. Domäne II, die Translokationsdomäne (AS 253 - AS 364) ist für die Translokation von PEA über die Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) in das Zytosol verantwortlich und Domäne III, die Toxindomäne (AS 405 - AS 613) enthält die ADP-Ribosylierungsstelle (Hwang *et al.*, 1987; Siegall *et al.*, 1991).



**Abbildung 1: Zytotoxischer Weg von nativem *Pseudomonas* Exotoxin A und einem exemplarischen scFv-PE38-basierten Immuntotoxin, dem dsFv-antiCD22-PE38.** C-terminales Lysin (K), Plasma-Carboxypeptidase (PCP), Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 1 (LRP1), frühes Endosom (EE), Proteindisulfid-isomerase (PDI), spätes Endosom (LE), Trans-Golgi-Netzwerk (TGN), KDEL-Rezeptor (KDEL-R), Detergenz resistente Mikrodomänen (DRM), Caveosomen (CS), eukaryotischer Elongationsfaktor-2 (eEF-2). Abbildung aus Weldon & Pastan, 2011. Erklärung siehe Text.

Der zytotoxische Weg des nativen PEA ist in Abbildung 1 dargestellt. Nach der Abspaltung des C-terminalen Lysins durch die Plasma-Carboxypeptidase [1] bindet das native PEA an den Membranrezeptor LRP1 [2] und wird durch Clathrin-vermittelte Endozytose von der Zelle aufgenommen [3]. Im frühen Endosom wird die Domäne II des PEA durch Furin und die Proteindisulfid-isomerase abgespalten [4]. Danach gelangt das enzymatisch aktive PEA-Fragment Rab9-abhängig über das späte Endosom in das Trans-Golgi-Netzwerk [5 b]. Nachdem es an den KDEL-Rezeptor gebunden hat, wird das PE-Fragment, vermittelt durch die Heterosin-Kinase Src, in das ER transportiert [6]. Nach der Abspaltung gelangt das Toxin-Fragment des PEA Rab6-abhängig über den Lipid-abhängigen-Sortierungsweg direkt in das ER [7]. PEA -Fragmente, die das ER erreicht haben, werden über den Protein-Translokations-Komplex Sec61 in das Zytosol exportiert [8], wo sie die Protein-Synthese hemmen [9]. Dieses geschieht, indem sie den am Ribosom gebundenen eukaryotischen Elongationsfaktor-2 durch ADP-Ribosylierung hemmen, was wiederum zur Apoptose der Zelle führt [10].

PEA wird zum Beispiel für die Konstruktion von Immuntoxinen verwendet, die gegen diverse Krebsformen und die Infektion mit dem HIV entwickelt werden (Becker & Benhar 2012; Denton *et al.*, 2014). Der Vorteil von AB-Toxinen wie dem PEA, aber auch dem Diphtherie-Toxin bei der Konstruktion von Immuntoxinen ist, dass die Zieldomäne weder für die Stabilität, noch für die Aktivität der zytotoxischen Domäne notwendig ist. Sie kann daher durch eine beliebige rezeptorbindende Domäne ersetzt werden, wobei die Toxinkomponente kaum etwas von ihrer ursprünglichen Aktivität einbüßt (Weldon & Pastan, 2011). Diese Eigenschaft konnte genutzt werden, indem ein verkürztes aber wirksames Derivat von PEA konstruiert wurde, bei dem die Zieldomäne I entfernt wurde; das resultierende Toxin wurde als PE38 bezeichnet (Siegall *et al.*, 1991). Die Zieldomäne kann für die Konstruktion eines Immuntoxins zum Beispiel durch ein gegen einen tumorassoziierten Membranrezeptor (z. B. CD22) gerichtetes Antikörperfragment ersetzt werden (Weldon & Pastan, 2011). In Abbildung 1 ist der mögliche Aufnahme- und Wirkmechanismus des resultierenden Immuntoxins dargestellt. Das PEA -basierte Immuntoxin, bei dem die Zieldomäne durch ein scFv-Fragment ersetzt wurde [I], wird durch Bindung an den Tumorassoziierten Rezeptor [II] und anschließende Endozytose in die Zelle eingeschleust [III]. Im frühen Endosom wird die Domäne II abgespalten, der weitere Wirkmechanismus erfolgt wie beim nativen PEA [4 - 11].

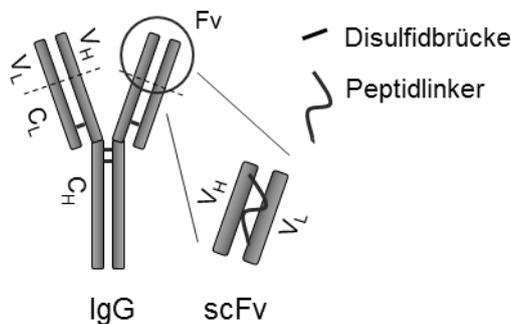
Verschiedene auf PE38 basierende Immuntoxine wurden in klinischen Versuchen auf ihr Potential als Krebsmedikament hin untersucht. Darunter das Immuntoxin RFB4-PE38, das gegen CD22 gerichtet ist und für die Behandlung von verschiedenen Formen der Leukämie erprobt wurde. PE38-basierte Immuntoxine wurden in klinischen Versuchen unter anderem für die Behandlung von soliden Tumoren getestet. Darunter waren das gegen Lewis Y gerichtete B3-PE38, das an Adenokarzinompatienten erprobt wurde und das gegen Mesothelin gerichtete SS1PE38, das zur Behandlung von Eierstock- und Pankreaskarzinom eingesetzt wurde (Becker & Benhar 2012).

In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls PE38 für die Konstruktion der Immuntoxine genutzt (Siegall *et al.*, 1991).

### 1.2.2 Zielkomponente scFv-e23

Als Zielkomponente für das erste Immuntoxin wurde ein scFv-Fragment des Antikörpers e23 verwendet, der gegen den Wachstumsfaktor-Rezeptor Her2/neu gerichtet ist. Das Onkogen *erbB2* kodiert für Her2/neu, eine 185 kDa große, transmembrane Glykoproteinkinase, die viele Homologien zum Epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptor-1 aufweist. Her2/neu ist eine von vier membranständigen Rezeptor-Tyrosinkinasen der

Familie der Epidermalen Wachstumsfaktoren. Die Amplifikation und Überexpression von *erbB2* in Tumorzellen konnte für verschiedene Krebsarten gezeigt werden, darunter Brustkrebs, Ovarialkrebs, Magenkrebs und Lungenkrebs (Lamond *et al.*, 2014, Verri *et al.*, 2005). Für einige aggressive Formen von Brustkrebs konnte die Überexpression von *erbB2* mit einer schlechten Prognose der Tumorerkrankung assoziiert werden (Lamond *et al.*, 2014).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung eines IgG-Antikörpers und seines scFv-Fragments.**

Antikörper, auch Immunglobuline (IgG) genannt, sind Proteine, die nicht-kovalent an ein Antigen (Protein, Lipid, o. ä.) binden können. IgG-Antikörper sind aus vier Polypeptidketten, zwei identischen schweren und zwei identischen leichten Ketten aufgebaut wobei die beiden schweren Ketten durch zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden und jeweils eine leichte Kette über eine Disulfidbrücke an eine schwere Kette gebunden ist (Abbildung 2). Die Bindung über Disulfidbrücken ist sehr stabil und gibt dem Antikörper gleichzeitig eine hohe Flexibilität. Die schweren Ketten sind aus vier, die leichten aus zwei IgG-Domänen zusammengesetzt, wobei die Sequenzen der IgG-Domänen am C-Terminus konstant sind. Sie werden mit  $C_L$  (*constant light*) und  $C_H$  (*constant heavy*) bezeichnet. Die IgG-Domänen am N-Terminus sind jeweils hoch variabel und bilden die Antigenbindestelle; diese werden mit  $V_L$  (*variable light*) und  $V_H$  (*variable heavy*) bezeichnet (Abbildung 2). Die Verwendung von Antikörpern als Zielkomponente bietet den Vorteil, dass Antikörper hochspezifisch, mit einer hohen Affinität und trotzdem reversibel an das Antigen binden.

Einen kritischen Punkt beim Design von Krebstherapeutika stellt die Größe des Medikamentes dar. Allgemein gilt, dass kleinere Medikamente schneller abgebaut werden als größere Medikamente, wodurch sich ihre Halbwertszeit verkürzt. Deshalb kann in tiefer gelegenen Geweben eine effektive Dosis nur durch erhöhte Medikamentengabe erreicht werden. Es gilt aber auch, je kleiner ein Medikament ist, desto einfacher kann es Gewebe und somit das Tumorgewebe durchdringen (Carter *et al.*, 2006). Je nach Anwendung ist es deshalb sinnvoll, die Größe des Therapeutikums zu variieren. Vor allem die Größe von Antikörpern, die in der Krebstherapie eingesetzt werden, kann deutlich reduziert werden, indem die therapeutischen Antikörper auf ihre funktionellen Teile reduziert werden. Zum Beispiel wird nur die Fv (*fragment variable*)-Region eines monoklonalen Antikörpers verwendet (Carter *et al.*, 2006). Die Fv-Region, die aus der  $V_H$ -Domäne und der  $V_L$ -Domäne besteht, ist die kleinste Untereinheit eines IgG, bei dem die Funktion des Antigenbindens

fast vollständig erhalten bleibt (Kasprzyk *et al.*, 1992). Werden diese beiden funktionellen Einheiten miteinander verbunden, so kann dies chemisch über die Bildung von Disulfidbrücken geschehen oder mit molekularbiologischen Methoden über das Einfügen eines Peptidlinkers, das resultierende Konstrukt wird dann als scFv-Fragment bezeichnet (Abbildung 2).

Während der letzten Jahre wurden einige PEA-basierte Immuntoxine, die gegen Her2/neu gerichtet sind, in klinischen Versuchen auf ihre Wirksamkeit hin untersucht. Beispiele sind das gegen Her2 gerichtete ERB-38, das an Brustkrebspatienten erprobt wurde und das FRP5-ETA, dessen Wirkung gegen Melanom, Brust- und Darmkarzinome untersucht wurde (Becker & Benhar, 2012). In der vorliegenden Arbeit wurde das scFv-Fragment des monoklonalen anti-Her2/neu-Antikörper e23 verwendet, welcher 1992 isoliert wurde. Es konnte gezeigt werden, dass die kombinierte Gabe der zwei monoklonalen anti-Her2/neu-Antikörper e21 und e23 das Wachstum einer humanen Magenkrebs-Zelllinie in xenographen Nacktmäusen hemmte (Kasprzyk *et al.*, 1992). Für das in der vorliegenden Arbeit verwendete scFv-e23 konnte in Bindeexperimenten gezeigt werden, dass das scFv-Fragment des Antikörpers e23 vergleichbare Hemmungswerte zeigt wie der originale Antikörper e23 (Kasprzyk *et al.*, 1992). Im direkten Vergleich konnte für verschiedene Her2/neu-positive Zelllinien gezeigt werden, dass die  $IC_{50}$  des scFv-Fragments von Herceptin, konjugiert mit Gelonin, gegenüber der  $IC_{50}$  eines Herceptin-Gelonin-Konjugats nicht oder maximal um den Faktor vier erhöht war (Cao *et al.*, 2014).

### 1.2.3 Zielkomponente VEGF<sub>165</sub>

Das VEGF<sub>165</sub> wurde als Zielkomponente für das zweite Immuntoxin verwendet. Dabei handelt es sich um eine der sechs Spleißformen von VEGF, die alle durch das Gen *vegf* kodiert werden, sich aber in ihren biochemischen und biologischen Eigenschaften stark voneinander unterscheiden. Das VEGF<sub>165</sub> ist ein Ligand sowohl des VEGFR-1, als auch des VEGFR-2; letzteres wird hauptsächlich auf vaskulären, endothelialen Zellen exprimiert (Papadopoulos *et al.*, 2012).

Tumore, die auf einen Durchmesser von mehr als 0,2 bis 2 mm anwachsen, werden nicht mehr ausreichend mit Sauerstoff versorgt und dadurch hypoxisch. Die Hypoxie ist auf die verringerte Blutversorgung zurückzuführen, da der schnell wachsende Tumor nicht ausreichend mit Blutgefäßen durchzogen ist. Als Folge wird der sogenannte angiogenetische Switch in den Tumorzellen ausgelöst, dabei fördern proangiogenetische Faktoren die Ausdifferenzierung von vaskulären, VEGFR-positiven Endothelzellen, die im Körper von Erwachsenen normalerweise dormant sind, außerdem wird vom Tumor vermehrt VEGF

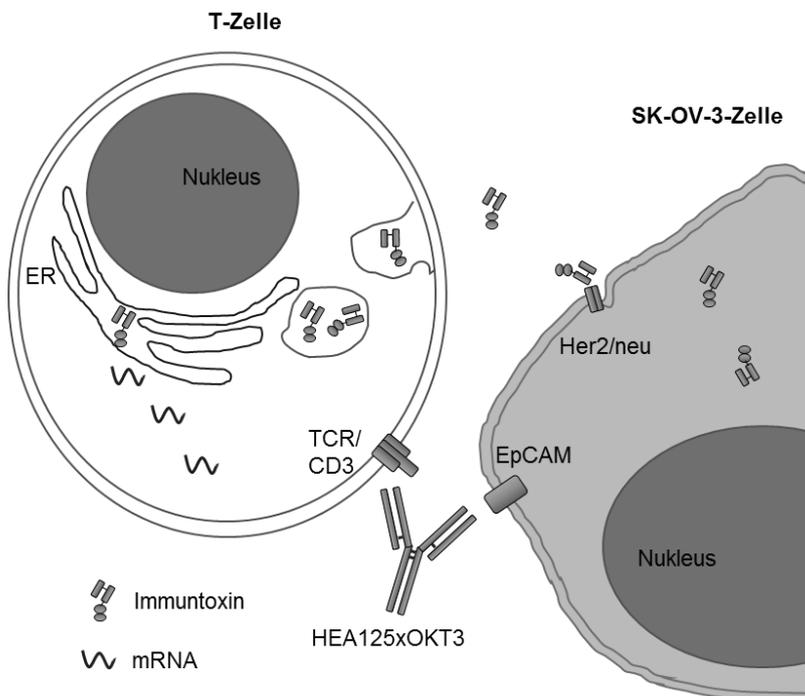
produziert (Robinson & Stinger, 2001). Die Liganden für die VEGF-Familie bilden Tyrosin-Kinase-Rezeptoren, die VEGF-Rezeptoren VEGFR-1, VEGFR-2 und VEGFR-3, die ebenfalls in neovaskulären Zellen des Tumors überexprimiert werden. Als Antwort auf die Bindung von VEGF aktivieren sie die Neubildung von Blutgefäßen, die Vaskulogenese, und das Wachstum und die Sprossung bereits bestehender Blutgefäße, ein Prozess, der als Angiogenese bezeichnet wird (Papadopoulos *et al.*, 2012). Die Neoangiogenese führt zum Wachstum des Tumors, da dieser mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt wird. Die Letalität des Tumors erhöht sich ebenfalls, da dieser über das neu entstandene vaskuläre System streuen kann (Shahneh *et al.*, 2013). Deshalb werden verschiedene Krebs-Therapien entwickelt, die eine Schädigung der Vaskulatur des Tumors zum Ziel haben, dabei wird die Ausbildung und das Wachstum der Neovaskulatur des Tumors unterdrückt, was zu einer Unterversorgung und in Folge zu einer Regression des Tumors führt. Ein weiterer Vorteil, den die Bekämpfung von Tumoren über die Schädigung der Neovaskulatur bietet, ist die leichte Erreichbarkeit durch das Medikament. Dieses muss das Endothel nicht erst überwinden, um an den Wirkort zu gelangen, der Tumor kann so indirekt aber ebenfalls effektiv geschädigt werden.

In den vergangenen Jahren wurden mehrere Krebs-Therapien entwickelt, bei denen VEGFR-2 als Zielmolekül diente. Bevacizumab ist ein humanisierter, monoklonaler Antikörper, der alle humanen Isoformen von VEGF<sub>165</sub> neutralisiert und dadurch als Angiogenesehemmer wirkt (Ferrara *et al.*, 2005). Er wurde im Jahr 2005 von der FDA als Krebstherapeutikum zugelassen und ist zur Zeit in Europa in Kombinations-Therapien gegen sechs verschiedene Krebserkrankungen zugelassen (Fachinformation Avastin, 2017). Ebenso wurden einige PEA-basierte Immuntoxine, die gegen den VEGFR-2 gerichtet sind, in den vergangenen Jahren entwickelt und auf ihre Wirkung hin untersucht. Mit dem chemisch konjugierten Immuntoxin VGRNb-PE, einem VEGFR-2-spezifischen Nanobody der mit PE38 fusioniert ist, konnte eine VEGFR-2-spezifische Aufnahme und eine Hemmung des Tumor-Wachstums *in vitro* gezeigt werden (Behdani *et al.*, 2013). Eine Therapie mit Immuntoxinen bietet gegenüber Antikörpern die Vorteile, dass das Tumorstadium stärker und länger anhaltend gehemmt wird, da Immuntoxine sowohl die Bildung der Neovaskulatur hemmen, als auch schon bestehende Neovaskulatur zerstören können (Niederman *et al.*, 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurde das VEGF<sub>165</sub> für die Konstruktion eines Immuntoxins verwendet, da für dieses bereits eine hohe Bindeaffinität gegenüber dem VEGFR-2 gezeigt werden konnte (Jin *et al.*, 2002).

### 1.3 Kombination von adoptiver T-Zell-Therapie mit Immuntoxinen

Bei der Behandlung eines Tumors kann die Kombination von zwei Therapien im Idealfall zu einem synergistischen Effekt führen und die Effizienz der Behandlung erhöhen.



**Abbildung 3: T-Zelle und Tumorzelle.** Immuntoxinsekretierende T-Zelle wird über den bsAk HEA125xOKT3 mit Krebszelle gekoppelt. Immuntoxin wird über Her2/neu aufgenommen.

In der vorliegenden Arbeit soll eine bsAk-vermittelte adoptive T-Zell-Therapie mit der Applikation von Immuntoxinen, die durch die T-Zellen exprimiert und sekretiert werden, kombiniert werden. Die Nebenwirkungen bei adoptiven T-Zell-Therapien können gravierend sein, da die T-Zellen auch an normale Körperzellen binden. Die Behandlung von CD19<sup>+</sup> B-Zell-Erkrankungen durch eine CAR-T-Zell-Therapie kann aufgrund von akuten

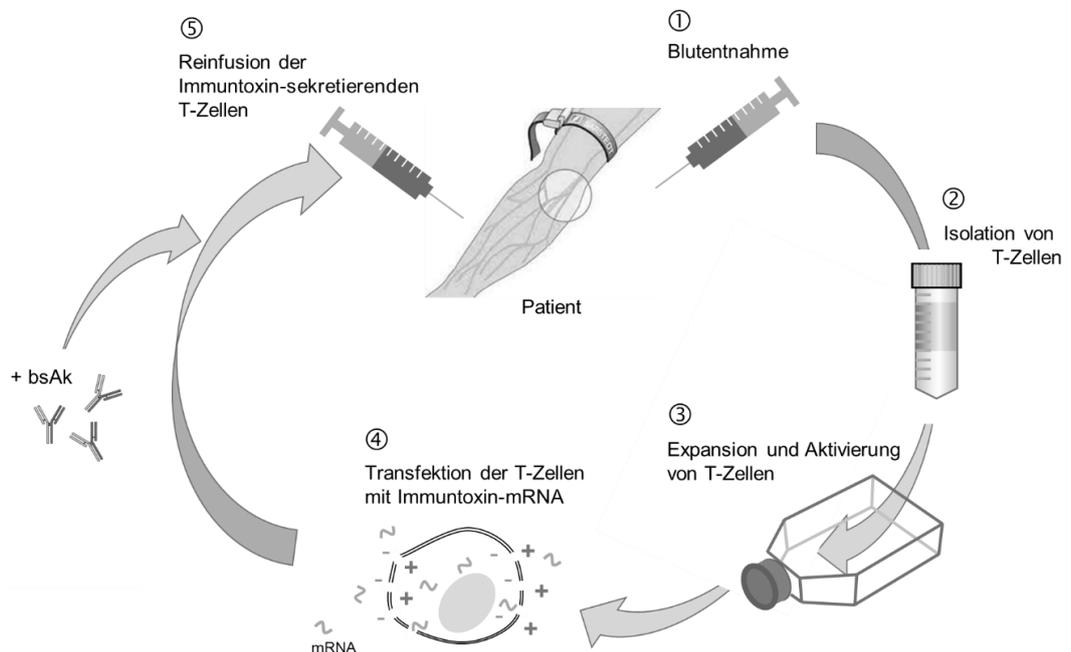
Vergiftungserscheinungen und B-Zell-Aplasie tödlich sein (Penell *et al.*, 2006). Genauso können beim Einsatz von Immuntoxinen Nebenwirkungen auftreten. Nicht-spezifische Bindungen der Immuntoxine an vaskulären Zellen wurden beobachtet, was in der Folge häufig zu unspezifischer Toxizität und zum Vascular-Leak-Syndrom führte (Cao *et al.*, 2009). Dieses hat im Rahmen einer Therapie mit dem Immuntoxin Denileukin diftotox schon zu mehreren Todesfällen geführt (Avarbock *et al.*, 2008). Ebenso ist bei der wiederholten Gabe von Immuntoxinen eine Immunreaktion zu erwarten (Hassan *et al.*, 2016).

Werden eine bsAk-vermittelte adoptive T-Zell-Therapie und eine Therapie mit Immuntoxinen kombiniert, kann es durch die Kombination der beiden Therapien zu einem synergistischen Effekt kommen. Die T-Zellen produzieren und sekretieren die Immuntoxine am Wirkort und werden dadurch in ihrer eigenen zytotoxischen Wirkung unterstützt (Abbildung 3). Der synergistische Effekt ermöglicht es, weniger Wirkstoff einzusetzen wodurch Nebenwirkungen reduziert werden können. Aufgrund der Eigenschaft von aktivierte T-Zellen zum Krebs zu wandern, bietet der Einsatz von transient transfizierten T-Zellen als Carrier den Vorteil, dass das Immuntoxin erst am Wirkort synthetisiert und freigesetzt wird. Dadurch wird die systemische Wirkung des Immuntoxins stark vermindert.

Außerdem führt die Expression und Sekretion des Immuntoxins am Wirkort zu einer lokalen Konzentrationserhöhung, wodurch wiederum geringere Konzentrationen eingesetzt werden können. Der zusätzliche Effekt durch das Immuntoxin soll die Wirkung der T-Zellen verstärken, wodurch diese ebenfalls in geringeren Mengen eingesetzt und mögliche Nebenwirkungen verringert werden können. Das Tumorgewebe von 205 Brustkrebspatientinnen wurde immunhistochemisch auf die Synthese der Tumormarker Her2/neu und EpCAM untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die gleichzeitige Überexpression beider Tumormarker ein Indikator für eine verminderte Überlebensrate ist (Spizzo *et al.*, 2002). Deshalb könnte eine kombinierte Therapie mit einem gegen Her2/neu gerichteten Immuntoxin und über den bsAk gegen EpCAM gerichteten T-Zellen eine wirksame Therapie gegen diese aggressive Form des Brustkrebses sein.

Immunzellen wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen auf ihre Fähigkeit hin untersucht, Immuntoxine zum Tumor zu transportieren. Für eins der ersten Plasmid-kodierten Immuntoxine, dem Her2neu/PE38, konnte eine erfolgreiche Expression in Lymphokin-aktivierten Killer-Zellen und eine erhöhte Zytotoxizität dieser Zellen gegenüber Her2/neu-positiven SK-OV-3-Zellen gezeigt werden (Chen *et al.*, 1997).

#### **Ablauf der Therapie**



**Abbildung 4: Schematischer Ablauf einer möglichen Behandlung.** Dargestellt sind die Gewinnung, die *ex vivo*-Manipulation und die Reinjektion der T-Zellen, die für eine Behandlung mit Immuntoxin-sekretierenden T-Zellen nötig wären. Erklärung siehe Text.

In Abbildung 4 ist der mögliche Ablauf einer Therapie mit Immuntoxin-sekretierenden T-Zellen dargestellt. Im Rahmen einer Therapie sollen dem Patienten periphere T-Zellen entnommen werden<sup>①</sup>. Die Verwendung körpereigener T-Zellen verhindert

Abstoßungsreaktionen, mit denen bei der Verwendung von körperfremden Spenderzellen zu rechnen wäre. Nach einer negativen Aufreinigung<sup>②</sup>, um eine Verunreinigung mit immunogenen oder toxischen Reagenzien zu verhindern, sollen die T-Zellen *ex vivo* expandiert und aktiviert werden<sup>③</sup>. Anschließend werden die T-Zellen mittels Elektroporation mit Immuntoxin-kodierender mRNA transfiziert<sup>④</sup> und gemeinsam mit einem Targeting-Device, zum Beispiel dem bsAk HEA125xOKT3, dem Patienten reinjiziert<sup>⑤</sup>. Am Tumor üben die T-Zellen, vermittelt durch den bsAk, den T-Zell-Effekt aus und sekretieren das Immuntoxin. Die Krebszellen sterben durch Apoptose und Nekrose, beziehungsweise bei dem gegen die Neovaskulatur gerichteten Immuntoxin wird die Vaskulatur geschädigt, was die Erreichbarkeit des Tumors durch die T-Zellen erleichtert bzw. den Tumor durch Unterversorgung schädigt.

## 1.4 Ziele und Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Herstellung von primären, humanen T-Zellen, die durch die Sekretion eines mRNA-kodierten Immunttoxins in Kombination mit dem Targeting-Device HEA125xOKT3 eine erhöhte Zytotoxizität gegenüber Her2/neu- und EpCAM-positiven Zielzellen zeigen sollten. Für die Konstruktion der Immunttoxine wurde ein scFv-Fragment des gegen Her2/neu gerichteten Antikörpers e23 molekularbiologisch mit einer Toxinkomponente konjugiert. Alternativ wurde ein Immuntoxin mit der Immunkomponente VEGF<sub>165</sub>, das gegen den VEGF-Rezeptor gerichtet ist, konstruiert. Als Toxinkomponente beider Immunttoxine wurde PE38, ein Derivat des PEA verwendet. *In vitro* translatierte mRNA, die für die Immunttoxine kodierte, sollte mittels Elektroporation in aktivierte, humane T-Zellen eingebracht werden. Die Elektroporation sollte mit eGFP als Modellprotein auf maximale Expression bei nicht beeinträchtigteter Vitalität hin optimiert werden. Um den Erfolg der Transfektion zu überprüfen, sollte die Expression der Immunttoxine, ihre Translokation und Sekretion, die mittels intrinsischem oder angefügten ER-Signalpeptid initiiert wurde, analysiert werden. Des Weiteren sollte die zytotoxische Aktivität der Immunttoxine gegenüber den Her2/neu-positiven bzw. VEGF-Rezeptor-positiven Zielzellen und die zytotoxische Aktivität der Immuntoxin-sekretierenden T-Zellen gegenüber den Her2/neu-positiven Zielzellen untersucht werden.

## 2 Materialien

### 2.1 Organismen

#### 2.1.1 Bakterienstamm

Für die Klonierungen, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, wurde der *Escherichia coli*-K12 Stamm XL1-Blue von Stratagene, CA (USA), verwendet. Genotypische Charakterisierung: (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacIqZΔM15 Tn10* (Tetr)]).

#### 2.1.2 Humane Zelllinien

Als mögliche Zielzellen für das Immuntoxin scFv-e23-PE38 wurden die Zelllinien SK-OV-3, MCF-7 und A549 verwendet; für die Synthese des Immuntoxins VEGF-PE38 wurde die Zelllinie HEK293 verwendet (Tabelle 1). Die Zellen wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, GE (DSMZ) und von der American Type Culture 1 Collection, Manassas, VA, USA (ATCC) bezogen.

**Tabelle 1: Zelllinien und ihre Herkunft**

Zelllinie	Beschreibung	Herkunft/Referenz
<b>MCF-7</b>	Humane Brustkrebszelllinie (Epithelium, Monolayer)	ATCC® HTB-22™
<b>SK-OV-3</b>	Humane ovarielle Krebszelllinie (Epithelium, Monolayer)	ATCC® HTB-77™
<b>HEK293</b>	Humane embryonale Nierenzelllinie (Fibroblasten, Monolayer)	DSMZ, ACC 305
<b>A549</b>	Humane Lungenkrebszelllinie (Epithelium, Monolayer)	DSMZ, ACC 107

#### 2.1.3 Primäre, humane Zellkulturen

Zur Synthese der eGFP-Konstrukte und Immuntoxine wurden primäre T-Zellen aus tagesfrischen humanen Buffy Coats, die in der Blutspendezentrale im Klinikum Saarbrücken präpariert wurden, gewonnen. Als Zielzellen für die VEGF-basierten

Immuntoxine wurden gepoolte, kryokonservierte Humane Venöse Nabelschnur-Endothelzellen (HUVEC) verwendet. In Tabelle 2 sind die Zellen aufgeführt.

**Tabelle 2: Primäre, humane Zellen und ihre Herkunft**

Zelltyp	Beschreibung	Herkunft/Referenz
<b>T-Zellen</b>	Humane, periphere T-Zellen	Aufgereinigt aus Buffy Coat
<b>HUVEC</b>	Humane, venöse Nabelschnur-Endothelzellen	PromoCell GmbH, Heidelberg, GE

## 2.2 Plasmide und Oligonukleotide

### 2.2.1 Plasmide für die Klonierung

Für die *in vitro*-mRNA-Synthese wurde der Expressionsvektor pGEM-4Z verwendet, der uns freundlicherweise von Niels Schaft, (Uniklinik Erlangen, GE) zur Verfügung gestellt wurde. Über den auf pGEM-4Z kodierten Polylinker wurden die Gene in den Vektor eingebracht. Der Polylinker wird von den RNA-Polymerase-Promotoren SP6 und T7 flankiert, von denen der T7 die T7-RNA-Polymerase effizient bindet und daher für die *in vitro*-mRNA-Synthese geeignet ist. Die zu klonierenden Gensequenzen- oder Sequenzabschnitte wurden konstruiert und bei Eurofins Genomics GmbH (Ebersberg, GE) zur Synthese in Bestellung gegeben (Tabellen 3 und 4).

**Tabelle 3: Klonierungsvektoren und ihre Herkunft**

Vektor	Eigenschaften	Herkunft/Referenz
<b>pGEM-4Z/EGFP</b>	Templat für eGFP	N. Schaft
<b>pGEM-4Z/A64</b>	Expressionsvektor	N. Schaft
<b>pBluescript II SK (+)toxin fragment 1</b>	Templat für PE38	diese Arbeit
<b>pCR2.1Ab fragment 1</b>	Templat für scFv-e23	diese Arbeit
<b>pEX-A-VEGF</b>	Templat für VEGF <sub>165</sub>	diese Arbeit

Die Immuntoxine e23-PE38 und VEGF-PE38 wurden, wie in Absatz 4.4.1 beschrieben, konstruiert. Da es sich bei PEA um ein bakterielles Protein handelt, wurde die Gensequenz für die Protein-Expression in humanen Zellen mit der Software GENEius von MWG Operon an den Codon Bias von *Homo sapiens* angepasst (Köhler & Wagner, 2007). Das Gen für die Toxinkomponente wurde in dem Vektor pBluescript II SK (+)toxin fragment 1 kodiert (Tabelle 3). Auch die Sequenz des scFv-Fragments des anti-Her2/neu-

Antikörpers e23 wurde mit der Software GENEius an den Codon Bias von *Homo sapiens* angepasst. Das Gen für die Zielkomponente e23 wurde in dem Vektor pCR2.1Ab fragment 1 und das Gen für die Zielkomponente VEGF<sub>165</sub> in dem Vektor pEX-A-VEGF kodiert (Tabelle 3). Die Aminosäuresequenz des Aminosäurelinkers L<sub>x</sub> wurde unter Berücksichtigung des Codon Bias von *Homo sapiens* in eine DNA-Sequenz übersetzt (AGTGGCGG-CCCTGAGGGGGGATCC) und für die Klonierung wurde eine BamHI-Schnittstelle in den Linker integriert (fett dargestellt). Die Gensequenz des Aminosäurelinkers L<sub>x</sub> wurde bei der Synthese der Plasmide pCR2.1Ab fragment 1 und pEX-A-VEGF bündig am 3'-Ende der jeweiligen Zielkomponente angefügt und bei der Synthese des auf dem Plasmid pBluescript II SK (+)toxin fragment 1 bündig am 5'-Ende der Toxinkomponente PE38 angefügt (Tabelle 3). Die Gensequenz des Signalpeptids von IFN $\gamma$  wurde auf den komplementären Primern ERS-2-forw und ERS-2-rev kodiert, die mit den Restriktionsschnittstellen für XbaI und NcoI flankiert waren (Tabelle 5). Die Synthese aller Vektoren und der Primer wurden bei MWG Operon in Auftrag gegeben.

Für die Klonierung der Immuntoxine wurde PE38 mittels Restriktion mit BamHI und XmaI in die Vektoren pEX-A-VEGF und pCR2.1Ab eingesetzt. Die so entstandenen Sequenzen für die Immuntoxine wurden über einen restriktionsenzymatischen Verdau mit XbaI und XmaI und anschließender Ligation in den Vektor pGEM4Z/A64 eingesetzt. Die resultierenden Expressionsvektoren pGEM-4Z/e23/PE38/A64 und pGEM-4Z/VEGF/PE38/A64 kodieren für e23-PE38 und VEGF-PE38. Für das Einfügen des Signalpeptids von IFN $\gamma$  in den Vektor pGEM-4Z/e23/PE38/A64 wurden die Primer ERS-2-forw und ERS-2-rev annealt. Mittels restriktionsenzymatischem Verdau mit XbaI und NcoI und anschließender Ligation wurde die Sequenz des Signalpeptids bündig, N-terminal der scFv-e23-Sequenz eingefügt. Der resultierende Vektor wurde mit pGEM-4Z/SP(i)/e23/PE38/A64 bezeichnet.

**Tabelle 4: Expressionsvektoren für die *in vitro*- Synthese, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit hergestellt wurden**

Plasmid	mRNA	Protein	Zielkompartiment
<b>pGEM-4Z/EGFP/A64</b>	eGFP	eGFP	Zytosol
<b>pGEM-4Z/SP(i)/EGFP/A64</b>	SP(i)-eGFP	eGFP	ER
<b>pGEM-4Z/SP(il)/EGFP/A64</b>	SP(il)-eGFP	eGFP	ER
<b>pGEM-4Z/SP(t)/EGFP/A64</b>	SP(t)-eGFP	eGFP	ER
<b>pGEM-4Z/scFv-e23/PE38/A64</b>	e23-PE38	e23-PE38	Zytosol
<b>pGEM-4Z/SP(i)/scFv-e23/PE38/A64</b>	SP(i)-e23-PE38	e23-PE38	ER
<b>pGEM-4Z/VEGF/PE38/A64</b>	VEGF-PE38	VEGF-PE38	ER
<b>pGEM-4Z/VEGF<sub>165</sub>/PE38D/A64</b>	VEGF-PE38D	VEGF-PE38D	ER

## 2.2.2 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide für die gezielte Mutagenese wurden mit der Software NEBase Changer (NEB) erstellt und ihre Synthese wie die Synthese der Oligonukleotide für die PCR-Klonierung und der Sequenzierungsprimer bei Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg, GE in Auftrag gegeben (Tabelle 5). Die kodierenden Sequenzen sind fett dargestellt.

**Tabelle 5: Oligonukleotide für die Klonierung und Synthese**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz (5' → 3')</b>	<b>Verwendung</b>
<b>ERS-2-forw</b>	<b>TAATAACTGCAGACCATGAAATATAC AAGTTATATCTTGGCTTTTCAGCTCT GCATCGTTTTGGGTTCTCTTGGCTGT TACTGCGCCATGGTAATAA</b>	Einfügen von SP(i)
<b>ERS-3-forw</b>	<b>TAATAACTGCAGACCATGTACAGGAT GCAACTCCTGTCTTGCATTGCACTAA GTCTTGCACCTGTCACAAACAGTGCC ATGGTAATAA</b>	Einfügen von SP(ii)
<b>ERS-4-forw</b>	<b>TAATAACTGCAGACCATGCACTACTG TGTGCTGAGCGCTTTTCTGATCCTGC ATCTGGTCACGGTCGCGCTCGCCAT GGTAATAA</b>	Einfügen von SP(t)
<b>ERS-2-rev</b>	<b>TTATTACCATGGCGCAGTAACAGCCA AGAGAACCCAAAACGATGCAGAGCT GAAAAGCCAAGATATAACTTGTATAT TTCATGGTCTGCAGTTATTA</b>	Einfügen von SP(i)
<b>ERS-3-rev</b>	<b>TTATTACCATGGCACTGTTTGTGACA AGTGCAAGACTTAGTGCAATGCAAG ACAGGAGTTGCATCCTGTACATGGTC TGCAGTTATTA</b>	Einfügen von SP(ii)
<b>ERS-4-rev</b>	<b>TTATTACCATGGCGAGCGGACCGTG ACCAGATGCAGGATCAGAAAAGCGC TCAGCACACAGTAGTGCATGGTCTG CAGTTATTA</b>	Einfügen von SP(t)
<b>E553D_F</b>	<b>GACGCTTGGAACCATCCTTG</b>	Mutagenese, Asp553 → Glu553
<b>E553D_F</b>	<b>CTCCTTCCTCCTCTGGCC</b>	Mutagenese, Asp553 → Glu553

## 2.3 Nährmedien für die Zellkultur

Die im Rahmen der Arbeit verwendeten Medien für die Zellkultur und die Kultivierung von *E. coli* sowie deren Hersteller sind in den Tabellen 6 und 7 aufgelistet.

**Tabelle 6: Nährmedien und Supplemente für die Zellkultur von humanen Zellen und Zelllinien und ihre Hersteller**

Medien und Supplemente	Hersteller
<b>Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)</b>	PAN Biotech, Aidenbach, GE
<b>Endothelzellen-Medium</b> ( <i>Endothelial Cell Growth Medium</i> , EGCM 2)	PromoCell GmbH, Heidelberg, GE
<b>Fötales Kälberserum</b> ( <i>foetal bovine serum</i> , FBS), hitzeinaktiviert	PAN Biotech, Aidenbach, GE
<b>Opti-MEM</b> , serumreduziert	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)
<b>Penicillin-Streptomycin-Lösung</b> (Pen/Strep) (10.000 units Penicillin/ml, 10 mg/ml Streptomycin/ml in 0,9 % NaCl gelöst)	Sigma Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, GE
<b>RPMI 1640</b> (L-Glutamine, 25 mM 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonat (Hepes), 2,2 g/l NaHCO <sub>3</sub> , mit/ohne Phenolrot)	PAN Biotech, Aidenbach, GE

**Tabelle 7: Medien für die Kultivierung von *E. coli* XL-1 Blue**

Medien und Supplemente	Hersteller
<b>Agar</b>	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, GE
<b>Ampicillin Natriumsalz</b> (Amp)	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, GE
<b>Lysogeny Broth (LB)-Medium</b>	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, GE

## 2.4 Antikörper

Die im Rahmen der Arbeit verwendeten Antikörper sowie deren Herkunft und Anwendung sind in den Tabellen 8 und 9 aufgelistet.

**Tabelle 8: Fluoreszenzmarkierte Antikörper und ihre Hersteller für die Durchflusszytometrie**

Antikörper	Beschreibung	Marker	Verdünnung	Hersteller
<b>anti-Her2/neu (c-new)</b>	Monoklonaler Maus-Antikörper, IgG <sub>1</sub>	FITC	1:20 (FC)	eBioscience, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)
<b>anti-human CD4</b>	Monoklonaler Maus-Antikörper, IgG <sub>1</sub>	FITC	1:2 (FC)	AbD Serotec (Bio-rad) Raleigh, NC (USA)
<b>anti-human CD8</b>	Monoklonaler Maus-Antikörper, IgG <sub>1</sub>	Alexa 647	1:2 (FC)	AbD Serotec (Bio-rad) Raleigh, NC (USA)
<b>anti-human CD3</b>	Monoklonaler Maus-Antikörper, IgG <sub>1</sub>	FITC	1:10 (FC)	AbD Serotec (Bio-rad) Raleigh, NC (USA)
<b>IgG<sub>1</sub> Negative</b>	Maus-Isotypen-Kontrolle	FITC	1:2 (FC)	AbD Serotec (Bio-rad) Raleigh, NC (USA)
<b>IgG<sub>1</sub> Negative</b>	Maus-Isotypen-Kontrolle	Alexa 647	1:2 (FC)	AbD Serotec (Bio-rad) Raleigh, NC (USA)

**Tabelle 9: Primäre und sekundäre Antikörper für Fluoreszenzmikroskopie, ELISA und Western-Analyse**

Antikörper	Beschreibung	Marker	Verdünnung	Hersteller
<b>Primäre Antikörper</b>				
<b>anti-PEA</b>	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper	-	1 : 5.000 (WB) 1 : 10.000 (ELISA)	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, GE
<b>anti-human-<math>\beta</math>-Aktin</b>	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper, IgG	-	1 : 2.000 (WB)	AbD Serotec (Bio-rad) Raleigh, NC (USA)
<b>anti-human VEGF (EE02)</b>	Monoklonaler Maus-Antikörper, IgG <sub>2b</sub>	-	1 : 50.000 (ELISA)	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TA (USA)
<b>anti-human Golgin-97</b>	Monoklonaler Maus-Antikörper, IgG <sub>1,k</sub>	-	2 $\mu$ g/ml (IF)	Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)
<b>Sekundäre Antikörper</b>				
<b>anti-Kaninchen IgG</b>	Ziege-Antikörper	HRP	1 : 5.000 (ELISA) 1:2.000 (WB)	Dianova GmbH, Hamburg, GE
<b>anti-Maus IgG</b>	Ziege-Antikörper	HRP	1 : 1.000 (WB)	Dianova GmbH, Hamburg, GE
<b>anti-Maus IgG</b>	Ziege-Antikörper, IgG <sub>1</sub>	Alexa Fluor 568	1 : 100 (IF)	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)

**HEA125xOKT3**

Der bsAk HEA125xOKT3 ist ein Immunkonjugat, bei dem der monoklonale Antikörper anti-human-Epitheliales-Zelladhäsionsmolekül (*epithelial cell adhesion molecule*, EpCAM) mit dem monoklonalen Antikörper anti-human CD3 konjugiert ist. HEA125xOKT3 wurde uns freundlicherweise von Herrn Gerhard Moldenhauer (Department of Translational Immunology, DKFZ Heidelberg, GE) zur Verfügung gestellt.

## 2.5 Chemikalien, Enzyme, Kits

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Chemikalien und Enzyme und ihre Hersteller sowie die verwendeten Kits inklusive Hersteller sind in Tabellen 10 und 11 aufgelistet.

**Tabelle 10: Chemikalien und Enzyme, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden und ihre Hersteller**

Bezeichnung Chemikalie Enzym	Hersteller
<b><math>\alpha</math>-Cyano-Zimtsäure</b>	Sigma Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, GE
<b>Accutase</b>	Sigma Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, GE
<b>Aceton, zur Synthese</b>	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, GE
<b>Acetonitril</b>	Fluka, Honeywell Int. Inc., Morris Plains, NJ (USA)
<b>Agar</b>	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, GE
<b>Agarose</b>	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, GE
<b>UltraPure™ Agarose</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)
<b>Alkalische Phosphatase</b> ( <i>calf intestine phosphatase, CIP</i> )	New England BioLabs Inc., Ipswich, MA (USA)
<b>Ammoniumbicarbonat</b>	Fluka, Honeywell Int. Inc., Morris Plains, NJ (USA)
<b>Ammoniumperoxidsulfat (APS)</b>	Sigma Aldrich, Merck KgaA, Darmstadt, GE
<b>Ammoniumsulfat</b>	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, GE
<b>Antarctic Phosphatase</b>	New England BioLabs Inc., Ipswich, MA (USA)
<b>Bisacrylamid</b>	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, GE
<b>Borsäure</b>	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, GE
<b>Bradford Reagent</b>	Sigma Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, GE
<b>Bromphenolblau Natriumsalz</b>	Sigma Aldrich, Merck KgaA, Darmstadt, GE
<b>Calcein AM</b>	PromoKine, PromoCell GmbH, Heidelberg, GE
<b>Calciumchlorid</b>	Sigma Aldrich, Merck KgaA, Darmstadt, GE
<b>Cell Culture Lysis-Puffer</b>	Promega, Madison, WI (USA)
<b>Collagen I Bovine</b>	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)
<b>Concanavalin A, Alexa Fluor® 350 conjugate</b>	Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)
<b>Coomassie Brilliant blue G-250</b>	Sigma Aldrich, Merck KgaA, Darmstadt, GE
<b>Diaminobenzidin (DAB)</b>	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, GE
<b>Diethyldicarbonat (DEPC)</b>	Sigma Aldrich, Merck KgaA, Darmstadt, GE
<b>Dimethylsulfoxid (DMSO)</b>	Sigma Aldrich, Merck KgaA, Darmstadt, GE
<b>Enhanced Chemiluminescence (ECL) Western Blotting Substrate</b>	Pierce Protein Biology Products, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)
<b>Erythrozytenlysepuffer</b>	Sigma Aldrich, Merck KgaA, Darmstadt, GE

<b>Essigsäure</b> (99,8 %)	Sigma Aldrich, Merck KgaA, Darmstadt, GE
<b>Mowiol Mounting Medium</b>	Sigma Aldrich, Merck KgaA, Darmstadt, GE
<b>Ethanol</b> (EtOH), absolut	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, GE
<b>Ethidiumbromid</b> (EtBr)	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, GE
<b>Ethylendiamintetraessigsäure</b> (EDTA)	Sigma Aldrich, Merck KgaA, Darmstadt, GE
<b>Formaldehyd</b> (FA)	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, GE
<b>Glycerin</b>	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, GE
<b>Glycin</b>	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, GE
<b>Halt™ Protease Inhibitor Cocktail</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)
<b>Interleukin-2</b> (IL-2), recombinant human protein	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)
<b>Isopropanol</b>	Sigma Aldrich, Merck KgaA, Darmstadt, GE
<b>Kap macetat</b>	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, GE
<b>BD Pharm Lyse™ Lyse-Puffer, 10 x</b>	BD Bioscience, Heidelberg, GE
<b>MACS-Puffer</b>	BD Bioscience, Heidelberg, GE
<b>Magermilchpulver</b>	Heirler Cenovis GmbH, Radolfzell, GE
<b>Manganchlorid</b>	Sigma Aldrich, Merck KgaA, Darmstadt, GE
<b>BD Matrigel™</b> (Growth Factor Reduced)	BD Bioscience, Heidelberg, GE
<b>β-Mercaptoethanol</b>	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, GE
<b>Methanol</b>	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, GE
<b>3-(N-Morpholino)- propansulfonsäure</b> (MOPS)	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, GE
<b>Natriumacetat</b> (NaAc)	Sigma Aldrich, Merck KgaA, Darmstadt, GE
<b>Natriumdodecylsulfat</b> ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> , SDS)	Sigma Aldrich, Merck KgaA, Darmstadt, GE
<b>Natriumhydroxid</b> (NaOH)	Sigma Aldrich, Merck KgaA, Darmstadt, GE
<b>Pancoll</b>	PAN Biotech, Aidenbach, GE
<b>Paraformaldehyde</b> 3,7 %	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)
<b>Phosphatgepufferte Salzlösung</b> ( <i>phosphate buffered saline</i> , PBS)	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)
<b>peqGOLD High Range RNA-Leiter</b>	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, GE
<b>Phosphorsäure</b>	Sigma Aldrich, Merck KgaA, Darmstadt, GE
<b>Phusion High-Fidelity DNA Polymerase</b>	Finzymes, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)
<b>Poly-L-lysine solution</b>	Sigma Aldrich, Merck KgaA, Darmstadt, GE
<b>Ponceau S</b>	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, GE
<b>Prestained Protein Marker, Broad Range</b> (7 - 175 kDa)	New England BioLabs Inc., Ipswich, MA

<b>Propidiumiodid (PI)</b>	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, GE
<b><i>Pseudomonas</i> Exotoxin A</b>	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, GE
<b>Q5 Hot Start High-Fidelity 2 x Master Mix</b>	New England BioLabs Inc., Ipswich, MA (USA)
<b>QuantaRed Enhanced Chemifluorescent HRP Substrate</b>	Pierce Protein Biology Products, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)
<b>Quick-Load® 2-log DNA Ladder</b>	New England BioLabs Inc., Ipswich, MA (USA)
<b>Restriktionsendonukleasen (BamHI, NcoI, PstI, SpeI, XbaI, XmaI)</b>	New England BioLabs Inc., Ipswich, MA (USA)
<b>Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>, BSA)</b>	Sigma Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, GE
<b>RNA-Laufpuffer</b>	New England BioLabs Inc., Ipswich, MA (USA)
<b>RNaseZap™</b>	Ambion, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)
<b>Rotiphorese Gel 30</b>	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, GE
<b>Rubidiumchlorid</b>	Sigma Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, GE
<b>Salzsäure (HCl)</b>	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, GE
<b>Stickstoff (N<sub>2</sub>)</b>	Air Liquide, Düsseldorf, GE
<b>T4-DNA-Ligase</b>	New England BioLabs Inc., Ipswich, MA (USA)
<b>Tetramethylethyldiamin (TEMED)</b>	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, GE
<b>Trifluoressigsäure (TFA)</b>	Merck KGaA, Darmstadt, GE
<b>Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)</b>	Merck KGaA, Darmstadt, GE
<b>Trypsin (sequencing grade)</b>	Promega, Madison, WI (USA)
<b>Trypsin/EDTA-Lösung</b>	PAN Biotech, Aidenbach, GE
<b>Tween 20</b>	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, GE
<b>Immobilon™ Transfer Membran</b>	Merck Millipore, Darmstadt, GE

**Tabelle 11: Kits, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden und ihre Hersteller**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Cell Proliferation Reagent WST-1</b>	Hoffmann-La Roche AG, Basel, CH
<b>Human IFN-<math>\gamma</math> ELISA Set</b>	BD Bioscience, Heidelberg, GE
<b>mMESSAGE mMACHINE™ T7 Transkription Kit</b>	Ambion, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)
<b>Phusion™ Site-Directed Mutagenesis Kit</b>	Finnzymes, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)
<b>QuantaRed™ Enhanced HRP</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)
<b>QIAquick Gel Extraktion Kit</b>	Qiagen N. V., Venlo, NL
<b>QIAGEN® Plasmid Purification</b>	Qiagen N. V., Venlo, NL
<b>QIAprep Mini/Maxiprep</b>	Qiagen N. V., Venlo, NL
<b>RosetteSep™ Human T Cell Enrichment Cocktail</b>	Stemcell, Vancouver, CA (USA)
<b>RosetteSep™ Human CD4<sup>+</sup> T Cell Enrichment Cocktail</b>	Stemcell, Vancouver, CA (USA)
<b>RosetteSep™ Human CD8<sup>+</sup> T Cell Enrichment Cocktail</b>	Stemcell, Vancouver, CA (USA)
<b>T cell Activation/Expansion Kit, human</b>	MACS, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, GE

## 2.6 Geräte

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Geräte sind in Tabelle 12 dargestellt.

**Tabelle 12: Geräte, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, ihre Gerätetypen und Hersteller**

<b>Gerät</b>	<b>Typ</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Durchflusszytometer</b>	FACS Calibur	Becton Dickinson & Co., Heidelberg, GE
<b>Fluoreszenzmikroskop</b>	Olympus IX 71	Olympus Europa SE & Co KG, Hamburg, GE
<b>Kamera</b>	F-View	Olympus Europa SE & Co KG, Hamburg, GE
<b>Inverses Lichtmikroskop</b>	Olympus CKX 41	Olympus Europa SE & Co KG, Hamburg, GE
<b>Kamera</b>	LC20	Olympus Europa SE & Co KG, Hamburg, GE
<b>Zell-Analysegerät</b> (CASY-Cell Counter)	CASY Model TT	Innovatis, Bielefeld, GE
<b>BTX 830 Elektroporator</b>	Electro Square Porator ECM 830	BTX Harvard, Holliston, MA (USA)
<b>Fluoreszenz-Mikrotiterplatten-Photometer</b>	Modulus Microplate	Turner Biosystems, Sunnyvale, CA (USA)
<b>UV-Vis-Spektrophotometer</b>	Ultrospec 3100 pro	Biochrom Ltd., Cambridge, UK
<b>Spektralphotometer für Mikrotiterplatten (ELISA-Reader)</b>	Sunrise-Basic Tecan	Tecan Group Ltd., Männedorf, CH
<b>Elektroporator</b>	Amaza Nucleofector II	Lonza Group AG, Basel, CH
<b>Lumineszenz-Dokumentationssystem</b>	Chemidoc XRS	BioRad, München, GE
<b>Geldokumentationssystem</b>	E Box VX2	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, GE
<b>PCR-Cycler</b>	Pegstar 96 universal gradient	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, GE
<b>Ultraschall-Aufschluss</b>	Sonificator Bandelin electronic 2200, Ultraschallnadel Bandelin electronic UW2200	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, GE
<b>Massenspektrometer</b>	4800 MALDI-ToF/ToF	Applied Biosystems, Carlsbad, CA (USA)
<b>CO<sub>2</sub>-Inkubator</b>	Heracell 150i	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)
<b>Vakuumkonzentrator</b>	Speed Vac Concentrator 5308	Eppendorf AG, Hamburg, GE

## 3 Methoden

### 3.1 Molekularbiologische Methoden

#### 3.1.1 Kultivierung von Bakterien

*E. coli* XL1-Blue wurde in LB-Medium bei 37 °C auf dem Rundschtüttler kultiviert. Als Selektionsmarker wurde dem Medium 1 % (v/v) der Amp-Stammlösung zugesetzt. Für die Vereinzelung von Plasmid-tragenden *E. coli*-Kulturen wurden diese bei 37 °C ÜN auf Amp-LB-Selektions-Platten im Brutschrank kultiviert.

##### Amp-Stammlösung:

50 % (v/v)	Ethanol
100 mg/ml	Amp

##### Amp-LB-Selektions-Platten:

5 % (w/v)	LB
1,5 % (w/v)	Agar
100 µg/ml	Amp

#### 3.1.2 Präparation von chemisch kompetenten Zellen von *E. coli*

Bakterien werden als kompetent bezeichnet, wenn sie in der Lage sind, fremde DNA aufzunehmen. Durch eine Behandlung von *E. coli* XL1-Blue mit Rubidiumchlorid wurde bei den Zellen eine chemische Kompetenz induziert, so dass diese mit Plasmiden oder Ligationsprodukten transformiert werden konnten. Um die chemische Kompetenz zu induzieren, wurden 200 ml einer *E. coli*-Kultur in der exponentiellen Wachstumsphase (OD<sub>600</sub>: 0,5 - 0,7) abgekühlt und anschließend durch Zentrifugation pelletiert (4.000 xg, 10 min, 4 °C). Das Pellet wurde in 80 ml eiskaltem Puffer 1 resuspendiert, für 5 min auf Eis inkubiert und wie oben pelletiert. Anschließend wurden die *E. coli*-Zellen in 8 ml eiskaltem Puffer 2 resuspendiert, als 500 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei - 80 °C gelagert.

Puffer 1:

30 mM	Kaliumacetat	pH 5,8	Essigsäure
100 mM	Rubidiumchlorid		
10 mM	Calciumchlorid		
50 mM	Manganchlorid		
15 % (v/v)	Glycerin		

Puffer 2:

10 mM	MOPS	pH 6,5	1 M KOH
10 mM	Rubidiumchlorid		
75 mM	Calciumchlorid		
15 % (v/v)	Glycerin		

**3.1.3 Transformation von *E. coli* XL1-Blue**

Chemisch kompetente *E. coli* XL1-Blue wurden durch einen Hitzeschock mit Plasmid-DNA oder Ligationsprodukten transformiert. Dazu wurden 100 µl einer frisch aufgetaute, kompetente *E. coli* -Kultur mit 10 – 100 ng eines Ligationsansatzes oder Plasmidstocks versetzt, gevortext und für 20 – 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 90 sek einem Hitzeschock von 42 °C ausgesetzt und wieder für 5 min auf Eis inkubiert. Die Ansätze wurden mit 900 µl antibiotikafreiem LB-Medium versetzt und nach einer Inkubation von 1 h bei 37 °C pelletiert (1.500 xg, 5 min, RT). Die Bakterien wurden anschließend in einigen µl LB-Medium resuspendiert und auf Amp-LB-Selektions-Platten ausplattiert. Die Platten wurden bei 37 °C ÜN inkubiert und am folgenden Tag Einzelkolonien für weitere Klonierungsschritte selektiert.

**3.1.4 Isolierung von Plasmid-DNA**

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* XL1-Blue -Zellen wurde mit dem QIAGEN Plasmid Mini Kit oder dem QIAGEN Plasmid Maxi Kit durchgeführt. Die Plasmid-DNA einer 5 ml ÜN-Kultur respektive einer 150 ml Kultur wurde nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die Plasmide wurden mit TE-Puffer aus den Kits oder Wasser eluiert und die Aliquots bei -20 °C gelagert. Mit dem UV-Vis-Spektrometer wurden die Konzentration und die Reinheit der DNA in wässriger Lösung bestimmt. Gemessen wurde die Absorption bei 260 nm, mit Hilfe derer die Konzentration berechnet wurde ( $A_{260} = 1,0 = 50 \mu\text{g/ml}$ ) und die Absorption bei 280 nm, um über das Verhältnis der Absorption von 260 nm zu 280 nm die Reinheit zu bestimmen.

### 3.1.5 Agarosegelelektrophorese

Mittels horizontaler Agarosegelelektrophorese wurde DNA sowohl für die Analyse als auch für präparative Zwecke im Agarosegel aufgetrennt. Bei diesem Verfahren wird negativ geladene DNA in Abhängigkeit von ihrer Größe im elektrischen Feld aufgetrennt. In der vorliegenden Arbeit wurden 0,8 %ige Agarosegele verwendet, mit denen sich DNA-Fragmente der Länge 0,7 kb bis 10 kb gut auftrennen lassen. Um die DNA zu beschweren und die Lauffront zu markieren, wurde die Probe vor dem Auftragen auf das Gel mit DNA-Probenaufgabepuffer versetzt. Die gelelektrophoretische Auftrennung der Proben erfolgte bei einer Spannung von 120 V in einer Febikon E-H2 Gelelektrophorese-Kammer in TBE-Puffer. Das im Agarosegel enthaltene Ethidiumbromid interkalierte in die DNA und konnte so mit UV-Licht der Wellenlänge 320 nm im Geldokumentationssystem E Box VX2 detektiert werden. Für die ungefähre Bestimmung des Molekulargewichts der DNA wurde der Molekulargewichtsmarker Quick-Load® 2-log DNA Ladder verwendet.

#### TBE (Tris-Borat-EDTA)-Puffer:

900 mM	Tris	
900 mM	Borsäure	
2 mM	EDTA	pH 8,0

#### Agarosegel:

0,8 % (w/v)	Agarose, in 1 x TBE-Puffer gelöst
0,1 µg/ml	Ethidiumbromid

#### DNA-Probenaufgabepuffer (5 x):

10 mM	Tris/HCl	pH 8,0
1 mM	EDTA	pH 8,0
30 % (v/v)	Glycerin (96 %)	
0,05 % (w/v)	Bromphenolblau	

### 3.1.6 Denaturierende Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von mRNA mittels Agarosegelelektrophorese erfolgte nach demselben Prinzip wie die DNA-Agarosegelelektrophorese. Da RNA-Moleküle leicht Sekundärstrukturen ausbilden und das zu unterschiedlichem Laufverhalten im Gel führen kann, wurde die Gelelektrophorese von mRNA durch die Zugabe von Formaldehyd unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Vor dem Gellauf wurde die mRNA für 10 min bei 68 °C in RNA-Laufpuffer denaturiert. Die gelelektrophoretische Auftrennung der mRNA erfolgte in einem 1,2 %igen FA-Agarosegel bei einer Spannung von 60 V in einer Febikon-

Kammer in FA-Kammerpuffer. Die mit Ethidiumbromid markierte, im FA-Agarosegel aufgetrennte mRNA wurde mit UV-Licht der Wellenlänge 320 nm im Geldokumentations-system E Box VX2 detektiert. Für die Analyse des Molekulargewichts der mRNA wurde der Molekulargewichtsmarker peqGOLD High Range RNA-Leiter verwendet.

10 x Formaldehyd (FA)-Gelpuffer:

200 mM	MOPS
50 mM	NaAc
10 mM	EDTA (pH 8,0)
mit	8 M NaOH auf pH 7,0 einstellen
mit	DEPC-H <sub>2</sub> O auffüllen

FA-Agarosegel:

1,2 % (w/v)	Ultra Pure™ Agarose
1,8 % (v/v)	37 % Formaldehyd
0,1 µg/ml	Ethidiumbromid
10 % (v/v)	10 x FA-Puffer
mit	DEPC-H <sub>2</sub> O auffüllen

FA-Kammerpuffer:

2 % (v/v)	37 % Formaldehyd
10 % (v/v)	10 x FA-Gelpuffer
mit	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> auffüllen

Für die Herstellung des RNase-freien Diethyldicarbonat (DEPC)-H<sub>2</sub>O wurde H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> mit 0,1 % (v/v) DEPC versetzt und ÜN bei RT unter Rühren inkubiert. Anschließend wurde verbleibendes DEPC durch 30-minütiges Erhitzen im Schnellkochtopf zerstört.

### 3.1.7 DNA-Gelextraktion und NaAc/EtOH-Fällung

Die Banden der mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennten und mit Ethidiumbromid angefärbten DNA-Fragmente wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraktion Kit nach Angaben des Herstellers aus dem Gel extrahiert. Die gereinigte DNA wurde mit 30 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> oder Elutionspuffer eluiert. War die Konzentration der DNA nicht ausreichend für folgende Klonierungsschritte, so wurde eine NaAc/EtOH-Fällung durchgeführt. Die Fällung wurde nach folgendem Schema angesetzt und für die Präzipitation der DNA für 1 h bei -20 °C inkubiert. Anschließend wurde die DNA pelletiert (17.000 xg, 15 min, 4 °C) und das DNA-Pellet in dem entsprechenden Volumen H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> oder Elutionspuffer aufgenommen.

NaAc/EtOH-Fällung:

1	Volumenanteil	DNA-Lösung/Restriktionsansatz
1/20	Volumenanteil	0,5 M EDTA
1/10	Volumenanteil	3 M Natriumacetat
2	Volumenanteile	Ethanol (absolut)

**3.1.8 Restriktionsenzymatischer Verdau von DNA**

Für die Klonierung und die *in vitro* -mRNA-Synthese wurde DNA restrektionsenzymatisch verdaut. Dabei wurden DNA-Stränge durch Restriktionsenzyme (Endonukleasen) an spezifischen Restriktionsschnittstellen geschnitten. Für die Restriktionen wurden Restriktionsenzyme und Puffer der Firma NEB nach Angaben des Herstellers verwendet. Plasmide, die als Template für die *in vitro* -mRNA-Synthese verwendet wurden, wurden standardmäßig in folgendem Restriktionsansatz linearisiert. Der Restriktionsansatz wurde bei 37 °C für 2 h inkubiert und anschließend wurde die linearisierte DNA mittels einer NaAc/EtOH-Fällung präzipitiert. Das DNA-Pellet wurde in 9 µl TE-Puffer gelöst und die Konzentration und Reinheit der DNA wurde mittels UV-Vis-Spektrometrie kontrolliert.

Restriktionsansatz:

<b>10 µg</b>	Vektor-DNA
10 µl	Puffer 4
10 µl	BSA (1:10)
10 µl	Restriktionsenzym
mit	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> auf 100 µl auffüllen

**3.1.9 Polymerase-Ketten-Reaktion**

Mit Hilfe der PCR können definierte DNA-Abschnitte *in vitro* amplifiziert werden, um sie zum Beispiel für weitere Klonierungsschritte einzusetzen. Hierzu wurden zwei gegenläufige, circa 20 Basen lange Oligonukleotid-Primer konstruiert, die spezifisch an die zu amplifizierende Template-DNA binden und den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt flankieren. Bei der Konstruktion der Primer war darauf zu achten, dass diese ähnliche Schmelz-Temperaturen ( $T_s$ ) haben, die neben der Primerlänge auch von der Basenzusammensetzung abhängig ist und nach der Wallace-Regel wie folgt berechnet wird:

$$T_s = 2 \cdot (A+T) + 4 \cdot (G+C) \quad [1]$$

Ausgehend von den PCR-Primern werden die DNA-Abschnitte durch hitzestabile Polymerasen in Zyklen amplifiziert. Ein Zyklus besteht aus der Denaturierung bei 97 °C, der

folgenden Hybridisierung der Primer bei einer gemittelten  $T_S$  der beiden Primer und der Elongation bei 72 °C, dem Temperaturoptimum für die Polymerase. Der PCR-Zyklus wurde 25 Mal wiederholt und von einer initialen Denaturierung und einer terminalen Elongation flankiert. Für die PCR wurde das Templat linearisiert und der PCR-Ansatz nach dem Protokoll der verwendeten Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase angesetzt. In Tabelle 13 ist ein exemplarisches PCR-Programm dargestellt.

#### PCR-Ansatz:

4 µl	Phusion HF Puffer (5 x)
0,4 µl	dNTPs (10 mM)
1 µl	Forwärtsprimer (0,5 µM)
1 µl	Rückwärtsprimer (0,5 µM)
<b>10 ng</b>	Templat
0,2 µl	Phusion DNA Polymerase
mit	H <sub>2</sub> O <sub>nukleasefrei</sub> auf 20 µl auffüllen

**Tabelle 13: Exemplarisches PCR-Programm**

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	97 °C	30 sek	
Denaturierung	97 °C	10 sek	25 x
Hybridisierung	65 °C	20 sek	
Elongation	72 °C	60 sek	
Terminale Elongation	72 °C	180 sek	

### 3.1.10 DNA-Ligation

Mittels Ligation konnten linearisierte DNA-Fragmente, die mit den passenden Restriktionsenzymen geschnitten wurden, passend verknüpft werden. Für die Ligation wurde die T4-DNA-Ligase verwendet, die die Veresterung zwischen einem 5'-Phosphat-Ende und dem komplementären 3'-Hydroxy-Ende zweier DNA-Fragmente katalysiert. Um eine Selbstligation der linearisierten DNA-Fragmente zu unterbinden, wurden diese mit alkalischer Phosphatase dephosphoriliert. Bei der Ligation mit Vektoren von circa 5 kbp war eine optimale Ausbeute bei einem Mengenverhältnis von Fragment : Vektor von 1 : 5 zu erwarten. Für einen Ligationsansatz wurden deshalb 50 ng Vektor-DNA eingesetzt und die Menge des einzusetzenden Inserts wurde nach folgender, vereinfachter Formel berechnet (Mülhardt, 2013).

$$X = \text{Masse (Fragment) [ng]} \frac{125 \text{ [ng]} \times \text{Länge (Fragment) [bp]} }{\text{Länge (Vektor) [bp]} } M \quad [2]$$

Da die Formel nur eine Annäherung an die optimalen Bedingungen beschreibt, wurde das Verhältnis von Insert : Vektor bei Bedarf variiert. Die Ligation wurde bei 16 °C ÜN oder bei RT für 2 h durchgeführt. Anschließend wurden die ligierten Plasmide mittels Transformation in chemisch kompetente *E. coli* XL1-Blue -Zellen eingebracht.

Ligationsansatz:

50 ng	restringierte Vektor-DNA
X ng	restringierte Insert-DNA
2 µl	10 x Ligase-Puffer
mit	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> auf 20 µl auffüllen

### 3.1.11 Primerhybridisierung

Zum Einfügen von mittellangen DNA-Sequenzen in vorhandene Vektoren wurden die benötigten Sequenzen und Komplementärsequenzen, flankiert von passenden Restriktionsschnittstellen, als Oligonukleotide *de novo* synthetisiert. Die Oligonukleotid-Paare wurden in Hybridisierungs-Puffer für 20 min bei 85 °C hybridisiert, langsam abgekühlt und für das anschließende Einfügen in den Zielvektor mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten.

Hybridisierungs-Puffer:

10 mM	Tris	pH 7.5	HCl
50 mM	NaCl		
1 mM	EDTA		

### 3.1.12 Gerichtete Mutagenese

Mittels gerichteter Mutagenese (*site directed mutagenesis*) ist es möglich, einzelne Basen oder kurze DNA-Abschnitte, unabhängig von Restriktionsschnittstellen, in einem Klonierungsschritt auszutauschen. Die auf Mutageneseprimern kodierte Mutation wird dabei mittels PCR in das Templat eingefügt; hierbei werden die neu synthetisierten Plasmide durch die Kinase phosphoryliert und durch die Ligase verknüpft. Nicht phosphorylierte Plasmide, die die Mutation nicht enthalten, werden durch restriktionsenzymatischen Verdau mit DpnI entfernt. Das Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit ermöglicht es, die gesamte Kinase-Ligase-DpnI (KLD)-Reaktion in einem Schritt durchzuführen. Die gerichtete Mutagenese wurde eingesetzt, um die Substitution einer Aminosäure im aktiven Zentrum der Toxinkomponente des Immuntoxins VEGF-PE38 einzuführen. Dazu wurden

Mutageneseprimer, auf denen die gewünschte Mutation kodiert war, mit der Software NEBaseChanger (New England BioLabs Inc., Ipswich, MA (USA)) konstruiert und zur Synthese bei MWG Operon in Auftrag gegeben. Die Mutation wurde in den Vektor pGEM-4Z/VEGF-PE38/A64 unter Verwendung der Mutageneseprimer E553D\_F und E553D\_R eingefügt. Für den folgenden PCR-Ansatz wurden 14 ng Templat eingesetzt. Das PCR-Programm für die gerichtete Mutagenese wurde auf maximale Plasmid-Ausbeute hin optimiert; wobei sich durch Variation der Hybridisierungstemperatur eine 2-Schritt-PCR als optimal erwies (Tabelle 14). NEB 5-alpha-kompetente *E.coli* wurden mittels Hitzeschock mit dem PCR-Ansatz transformiert und auf Amp-LB-Selektionsplatten vereinzelt.

#### PCR-Ansatz:

12,5 µl	Q5 Hot Start High-Fidelity Master Mix (2 x)
1,25 µl	Mutageneseprimer, vorwärts (10 µM)
1,25 µl	Mutageneseprimer, rückwärts (10 µM)
1 µl	Templat
9 µl	H <sub>2</sub> O <sub>nukleasefrei</sub>

**Tabelle 14: PCR-Programm für die gerichtete Mutagenese**

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	98 °C	30 sek	25 x
Denaturierung	98 °C	10 sek	
Hybridisierung/Elongation	72 °C	60 sek	
Terminale Elongation	72 °C	120 sek	

### 3.1.13 *In vitro* -mRNA-Transkription

Die *in vitro* -mRNA-Transkription ermöglicht die Synthese von mRNA, die der mRNA in den meisten eukaryotischen Organismen sehr ähnlich ist. Mit dem mMACHINE<sup>®</sup> T7 Kit werden Expressionsvektoren mit der T7-RNA-Polymerase transkribiert und die mRNA wird durch den Einbau einer 7-Methyl-Guanosin-Cap-Struktur am 5'-Ende gegen Abbau geschützt. Expressionsvektoren, die als Template für die mRNA-Synthese dienten, wurden mittels restriktionsenzymatischem Verdau mit SpeI oder XbaI linearisiert. Über diese Restriktion wurde die mRNA-Synthese terminiert. Die *in vitro* -mRNA-Synthese wurde mit jeweils 1 µg linearisiertem Templat mit dem mMACHINE<sup>®</sup> T7 Kit nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach dem Verdau restlicher DNA mit Turbo DNase wurde die frisch gewonnene mRNA mit dem Ambion MEGAclean<sup>™</sup> Kit aufgereinigt und mit 50 µl Elutionspuffer eluiert. Mit dem UV-Vis-Spektrometer wurden die Konzentration und die Reinheit der mRNA in wässriger Lösung bestimmt. Gemessen wurde die Absorption

bei 260 nm, über die die Konzentration der mRNA bestimmt wurde ( $A_{260} = 0,1 = 40 \mu\text{g/ml}$ ) und die Absorption bei 280 nm, um über das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zu 280 nm die Reinheit zu bestimmen. Die *in vitro* synthetisierte mRNA konnte bei -80 C über mehrere Wochen gelagert werden, Aliquots wurden nicht wiederholt eingefroren. Für die Arbeit mit mRNA wurden RNase-freie Produkte verwendet und Geräte und Oberflächen regelmäßig mit RNaseZap™ gereinigt.

## 3.2 Methoden der Zellkultur

### 3.2.1 Isolierung von primären, humanen T-Zellen

Humane T-Zellen wurden aus tagesfrischen Buffy Coats gewonnen, die von der Blutspendezentrale des Klinikums Saarbrücken (Blutspendezentrale Saar-Pfalz gGmbH, Saarbrücken, GE) bezogen wurden. Dafür wurde eine Einverständniserklärung der Patienten gemäß der WMA Deklaration von Helsinki eingeholt. Die Aufreinigung von peripheren, primären T-Zellen erfolgte mit dem RosetteSep Human T Cell Enrichment Cocktail, dem RosetteSep Human CD4<sup>+</sup> bzw. dem CD8<sup>+</sup> T Cell Enrichment Cocktail. Diese nutzen das Prinzip der negativen Aufreinigung der unterschiedlichen T-Zell-Populationen, wobei nicht benötigte hämatopoetische Zellen mittels tetramerer Antikörper-Komplexe über Glycophorin A mit roten Blutkörperchen verbunden und diese Agglomerate dann durch Gradientendichtezentrifugation sedimentiert werden. Abweichend vom Protokoll des Herstellers wurden 0,5 ml Rosette Sep für 20 ml Buffy Coat eingesetzt. Diese wurden nach der Inkubation mit 10 ml PBS versetzt und die Agglomerate mittels Dichtegradientenzentrifugation (1200 xg, 20 min, RT, ohne Bremse) über 15 ml Pancoll entfernt. Die in der Phase verbleibenden T-Zellen wurden in Zellkulturmedium RPMI 1640 + 10 % (v/v) FBS + 1 % (v/v) Pen/Strep aufgenommen, gewaschen und die verbleibenden Erythrozyten bei Bedarf durch 5 min Inkubation in 2 ml Erythrozytenlysepuffer entfernt. Die so gewonnenen T-Zellen wurden in Zellkulturmedium in einer Konzentration von  $2,5 \times 10^6$  Zellen/ml aufgenommen.

### 3.2.2 Aktivierung und Kultivierung von primären, humanen T-Zellen

Die Aktivierung der frisch aufgereinigten T-Zellen, bzw. der CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> -T-Zellen wurde mit beladenen Anti-Biotin MACSiBead™ Partikeln des T cell Activation/ Expansion Kits durchgeführt. Die magnetischen Anti-Biotin MACSiBeads™ Partikel wurden zu gleichen Teilen mit biotinylierten Antikörpern gegen humane CD2, CD3 und CD28 gekoppelt, wodurch sie Antigen-präsentierende Zellen imitieren sollten. T-Zellen wurden in einer Konzentration von  $2,5 \times 10^6$  Zellen/ml in Kulturmedium aufgenommen und in einem Bead : Zelle-Verhältnis von 1 : 2 mit den gewaschenen Anti-Biotin MACSiBeads™ versetzt und im CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37 °C in einer mit Wasserdampf gesättigten und 5 % CO<sub>2</sub> enthaltenden Atmosphäre kultiviert. Nach einer Aktivierungsdauer von drei Tagen (sofern nicht anders angegeben) wurden die MACSiBead™ Partikel mittels Dichtegradientenzentrifugation über Pancoll (1200 xg, 20 min, RT, ohne Bremse) wieder entfernt. Für die anschließende Kultivierung der aktivierten T-Zellen wurde das RPMI 1640 + 10 % (v/v) FBS + 1 % (v/v) Pen/Strep mit 200 U/ml IL-2 supplementiert, um die Proliferation der T-Zellen zu fördern. Die aktivierten T-Zellen wurden alle drei bis vier Tage und die transfizierten T-Zellen alle zwei Tage passagiert, indem in einem Waschschrift (400 xg, 10 min, RT) das alte Medium entfernt und die Zellen in einer Konzentration von  $2,5 \times 10^6$  Zellen/ml in frischem Zellkulturmedium aufgenommen wurden.

### 3.2.3 Kultivierung von Zelllinien und HUVEC-Zellen

Die humanen Zelllinien MCF-7 und SK-OV-3 wurden in RPMI 1640 + 10 % (v/v) FBS + 1 % (v/v) Pen/Strep und die Zelllinien HEK293 und A549 in DMEM + 10 % (v/v) FBS + 1 % (v/v) Pen/Strep bei 37 °C in einer mit Wasserdampf gesättigten und 5 % CO<sub>2</sub> enthaltenden Atmosphäre im CO<sub>2</sub>-Inkubator kultiviert. Für das Passagieren der Zellen wurden die subkonfluenten Zell-Monolayer mit PBS gewaschen, mit Accutase oder Trypsin/EDTA (HEK293) abgelöst und im entsprechenden Zellkulturmedium aufgenommen. Nach einem Waschschrift (400 xg, 10 min, RT) wurden die Zellen in frischem Zellkulturmedium in einer Verdünnung von 1 : 2 - 1 : 8 in frische Zellkulturflaschen überführt.

Primäre, humane, venöse Nabelschnur-Endothelzellen (HUVECs) wurden als gepoolte kryokonservierte Kultur bezogen, bei der davon ausgegangen wird, dass der VEGF-Rezeptor auf der Zelloberfläche präsent ist und *in vitro* pseudovaskuläre Netzwerke ausgebildet werden können. Die Zellen wurden im Endothelial Cell Growth Medium 2 (EGCM 2), das mit 2 % (v/v) Serum und 1 % (v/v) Pen/Strep versetzt wurde, bei 37 °C in einer mit Wasserdampf gesättigten und 5 % CO<sub>2</sub> enthaltenden Atmosphäre im CO<sub>2</sub>-

Inkubator kultiviert. Für das Passagieren der Zellen wurde der subkonfluente HUVEC-Monolayer mit PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA bei 37 °C abgelöst und in Zellkulturmedium EGCM 2, das mit 10 % (v/v) FBS versetzt war, aufgenommen. Nach einem Waschschrift (400 xg, 10 min, RT) wurden die Zellen in frischem EGCM 2 Zellkulturmedium gelöst und in einem Verhältnis von 1 : 2 - 1 : 4 in frische Zellkulturflaschen überführt. Für die Versuche wurden die Passagen drei bis neun verwendet.

### **3.2.4 Zellzahlbestimmung**

Die Konzentration von Säugerzellen wurden mit dem CASY-Cell Counter unter Verwendung einer 150 µm Kapillare bestimmt, bei dem über den elektrischen Widerstand der Zellen ihr Durchmesser und ihre Vitalität bestimmt werden. Für jede zu messende Zelllinie und naive wie aktivierte T-Zellen wurde nach Angaben des Herstellers ein Programm erstellt, mit dem die Gesamtzellzahl und der Anteil der lebenden Zellen an der Gesamtzellzahl bestimmt wurde.

### **3.2.5 Kryokulturen von primären Säugerzellen und Säugerzelllinien**

Die Zelllinien und die HUVEC-Zellen wurden in flüssigem Stickstoff in der Gasphase oder in der Flüssigphase (HUVEC) gelagert. Für das Einfrieren wurden die Zellen in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  -  $1 \times 10^7$  Zellen/ml in entsprechendem antibiotikafreiem Nährmedium, das mit 20 % (v/v) FBS und 10 % (v/v) Gefrierschutzmittel Dimethylsulfoxid versetzt war, gelöst. Aliquots wurden dauerhaft in Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff gelagert. Um die Zellen in Kultur zu nehmen, wurden diese im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, sofort im entsprechenden Kulturmedium verdünnt, einmal gewaschen (400 xg, 10 min, RT) und bei 37 °C im CO<sub>2</sub>-Inkubator kultiviert. Das Einfrieren und Auftauen der HUVEC-Zellen wurde entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt.

### **3.2.6 Elektroporation von T-Zellen**

Die Elektroporation wurde verwendet, um mRNA, die für die verschiedenen Formen des eGFP und der Immuntoxine kodiert, in die T-Zellen einzubringen. Bei der Elektroporation wird über einen kurzen Zeitraum ein elektrisches Feld an den Zellen angelegt wodurch deren Zellmembran für die Dauer des Pulses permeabel wird, so dass die Nukleinsäuren in die Zelle gelangen können. Bei der Transfektion von T-Zellen mit

Nukleinsäuren ist die Elektroporation die Methode der Wahl. Vor der Transfektion wurden die MACSiBeads aus der Zellkultur entfernt, da diese magnetisch sind und die Elektroporation beeinträchtigen würden. Die T-Zellen wurden für die Transfektion einmal mit PBS und zweimal mit Opti-MEM gewaschen (300 xg, 10 min, RT). Für die Elektroporation wurden  $5 \times 10^6$  T-Zellen, gelöst in 200  $\mu$ l Opti-MEM, für 10 min auf Eis gekühlt und in eine auf Eis vorgekühlte Elektroporationsküvette gegeben. Die Zellsuspension wurde mit ebenfalls vorgekühlter mRNA versetzt und unmittelbar darauf mit dem BTX 830 Elektroporator elektroporiert. Die Elektroporationsparameter für T-Zellen sind in Tabelle 19 dargestellt. Unmittelbar nach der Transfektion wurden die T-Zellen in 3 ml vorgewärmtes Zellkulturmedium überführt und im CO<sub>2</sub>-Inkubator kultiviert.

### 3.2.7 Elektroporation von HEK293 Zellen

Die Transfektion von HEK293-Zellen mit eGFP- und Immuntoxin-kodierender mRNA wurde ebenfalls mittels Elektroporation mit dem BTX 830 Elektroporator durchgeführt. Da es sich um eine Transfektion mit einem Square Wave-Elektroporator in Lösung handelte, für die für HEK293-Zellen kein Protokoll existierte, wurde ein Protokoll entwickelt und die Parameter optimiert. Für die Elektroporation wurden subkonfluente HEK293-Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst, da diese Methode im Vergleich zum Ablösen mit Hilfe von gekühltem PBS, Accutase oder durch Scratches die Vitalität der HEK293-Zellen am wenigsten beeinträchtigte. Die HEK293-Zellen wurden einmal in PBS und zweimal in Opti-MEM gewaschen (400 xg, 10 min, RT). Anschließend wurden die HEK293-Zellen in einer Konzentration von  $2,5 \times 10^7$  Zellen/ml aufgenommen.  $5 \times 10^6$  HEK293-Zellen wurden für 10 min auf Eis gekühlt und die Zellsuspension und ebenfalls vorgekühlte mRNA wurden in eine auf Eis vorgekühlte 4 mm Elektroporationsküvette gegeben und unmittelbar darauf mit dem BTX 830 Elektroporator elektroporiert. Die Standardeinstellungen für die Elektroporation von HEK293-Zellen sind in Tabelle 21 dargestellt. Unmittelbar nach der Transfektion wurden die HEK293-Zellen in 7 ml vorgewärmtem Zellkulturmedium in eine 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche überführt und im CO<sub>2</sub>-Inkubator kultiviert.

### 3.2.8 Aufschluss humaner Zellen mittels enzymatischer Lyse

Um Proteine für weitere Analysen aus Zellen zu extrahieren, wurden diese enzymatisch lysiert. Jeweils 1,5 ml T-Zellkultur wurden dafür zweimal mit PBS gewaschen (300 xg, 10 min, RT) und in 20  $\mu$ l eiskaltem Cell Culture Lysis-Puffer resuspendiert. Der

Lyse-Puffer wurde zur Stabilisierung der Proteine nach Angaben des Herstellers mit dem Halt™ Protease Inhibitor Cocktail versetzt. Nach einer 5-minütigen Inkubationszeit auf Eis wurde der Zelldebris pelletiert (9.000 xg, 1 min, 4 °C) und der Überstand mit den löslichen Proteinen für die weitere Analyse entnommen. Für die enzymatische Lyse von adhärenenten HEK293 Zellen wurde der subkonfluente Monolayer einer 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche zweimal mit PBS gewaschen, mit 1 ml Cell Culture Lysis-Puffer für 5 min auf Eis inkubiert und die Zellsuspension aus der Flasche entnommen. Die löslichen Proteine wurden wie oben beschrieben aufgereinigt.

### 3.2.9 Aufschluss humaner Zellen mittels Ultraschall

Beim Zellaufschluss mittels Ultraschall wird durch kurzzeitiges Anlegen hoher Ultraschallwellen die Zellmembran zerstört, so dass intrazelluläre Proteine extrahiert werden können. Da der Zellsuspension bei dieser Methode keine Detergenzien zugefügt werden, wurde sie verwendet, um Zellen für die Massenspektrometrie aufzuschließen. Dafür wurden circa  $5 \times 10^6$  Zellen zweimal mit PBS gewaschen (300 xg, 10 min, RT) und in 2 ml eiskaltem Tris-Puffer gelöst. Für den Zellaufschluss wurde die Zellsuspension im Eisbad mit der Bandelin-Ultraschallnadel dreimal für jeweils 4 sek mit Abständen von 30 sek mit 10 % einer Power Amplitude von 200 Hz beschallt. Mittels einer Aceton/Methanol-Fällung wurden die Proteine aufgereinigt. Dazu wurde ein Teil Proteinlösung mit einem Teil eiskaltem Methanol und acht Teilen eiskaltem Aceton versetzt und die Proteine ÜN bei - 20 °C präzipitiert. Durch Zentrifugation wurden die Proteine pelletiert (4.000 xg, 10 min, 0 °C) und das Pellet anschließend in 100 µl Tris-Puffer gelöst.

#### Tris-Puffer:

50 mM	Tris	pH 7,5	HCl
1 x	Halt™ Protease Inhibitor Cocktail		
5 mM	EDTA		

## 3.3 Zellbiologische Assays

### 3.3.1 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode der Einzelzell-Analyse, in der verschiedene Eigenschaften einzelner Zellen wie deren Durchmesser, Granularität und

Fluoreszenzsignale detektiert werden. Durchmesser und Granularität einer T-Zelle können zum Beispiel Aufschluss über ihren Aktivierungsstatus geben. Über Färbungen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern können Subpopulationen voneinander unterschieden werden, indem diese in den verschiedenen Fluoreszenzkanälen detektiert werden (Tabelle 15). Auch die Fluoreszenzintensität des rekombinant exprimierten eGFP in T-Zellen konnte mittels Durchflusszytometrie analysiert werden. Für die Analyse wurden circa  $5 \times 10^5$  Zellen in 300  $\mu$ l MACS-Puffer resuspendiert, der mit 0,1 % (w/v) Natriumazid versetzt war. Die Messungen wurden mit dem FACS Calibur durchgeführt. Pro Messung wurden standardmäßig 10.000 Zellen analysiert, die Datenerhebung erfolgte mit der Software BD CellQuest™ Pro (Becton Dickinson & Co., Heidelberg, GE) und die Auswertung der Daten mit der Software FlowJo 7.6 (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA).

### 3.3.2 Zellfärbungen für die Durchflusszytometrie

Zum Nachweis von extrazellulären Membranproteinen auf T-Zellen oder Zelllinien mittels Durchflusszytometrie wurden Antikörperfärbungen durchgeführt. Dafür wurde ein Aliquot Zellen zweimal mit PBS gewaschen (300  $\mu$ g, 10 min, RT), in 300  $\mu$ l MACS-Puffer resuspendiert und mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper und der entsprechenden Isotypenkontrolle für 30 min bei RT inkubiert (Tabelle 8). Nach einem weiteren Waschschrift mit MACS-Puffer wurden die Fluoreszenzsignale der Antikörper im FACS Calibur im entsprechenden Fluoreszenzkanal detektiert (Tabelle 15). Um die Vitalität der Zellen zu bestimmen, wurde eine Propidiumiodid (PI)-Färbung durchgeführt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. PI ist ein Farbstoff, der durch die perforierte Membran von geschädigten Zellen dringen kann, wodurch diese Zellen angefärbt und so von lebenden Zellen unterschieden werden können. Interkaliert der Farbstoff in die DNA, emittiert das PI ein starkes Fluoreszenzsignal mit einem Maximum bei 617 nm. Für die PI-Färbung wurden die in MACS-Puffer gelösten Zellen mit 0,8  $\mu$ g/ml PI versetzt und für 10 min bei RT inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit MACS-Puffer wurde das PI-Signal mit dem FACS Calibur im Fluoreszenzkanal FL3-H detektiert (Tabelle 15).

**Tabelle 15: Kanäle des Durchflusszytometers mit zugehörigen Fluoreszenzfarbstoffen**

Fluoreszenzkanal	$\lambda$ Extinktion [nm]	$\lambda$ Emission [nm]	Fluoreszenzsignal
FL1-H	488	530/30	eGFP, FITC
FL2-H	488	585/42	-
FL3-H	488	> 650	PI, Alexa647
FL4-H	635	661/	-

### 3.3.3 Mikroskopie / Fluoreszenzmikroskopie

Die Durchlichtmikroskopie und die Fluoreszenzmikroskopie wurden verwendet, um die Morphologie und spezifische Strukturen, auch mit Hilfe von Färbungen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern oder anderen fluoreszenzmarkierten Markern, abzubilden. Auch die Expression von rekombinantem eGFP in transfizierten T-Zellen oder HEK293-Zellen wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die zu mikroskopierenden T-Zellen wurden für die Lebendzell-Mikroskopie in PBS + 0,1 % BSA gelöst und auf einen mit Poly-L-Lysin gecoateten Objektträger gegeben, wo sie mit einem Deckgläschen „fixiert“ wurden. Für die Lebend-Zell-Mikroskopie von adhärennten HEK293-Zellen wurden Deckgläschen mit Collagen I, Bovine nach Angaben des Herstellers für „thin layer coating“ beschichtet. Die Zellen wurden auf den Deckgläschen ausgesät und im CO<sub>2</sub>-Inkubator kultiviert. Anschließend wurde das Kulturmedium mit PBS + 0,1 % BSA abgewaschen und das Deckgläschen mit einigen µl PBS + 0,1 % BSA benetzt und auf einen Objektträger gegeben. Die Präparate wurden mit dem Olympus X71 im Durchlicht oder mit den entsprechenden Fluoreszenzfiltern (Tabelle 16) analysiert, für das 60x-Objektiv wurde Immersionsöl verwendet. Die Aufnahme und Analyse der Daten erfolgte mit der Software CellP (Olympus Europa SE & Co KG, Hamburg, GE). Für die Dokumentation der Zellkultur wurde das inverse Mikroskop Olympus CKX 41 verwendet.

**Tabelle 16: Filter des Fluoreszenzmikroskops mit zugehörigen Fluoreszenzfarbstoffen**

Filter	$\lambda$ Extinktion [nm]	$\lambda$ Emission [nm]	Fluoreszenzfarbstoff
<b>NU (blau)</b>	360 - 370	420	DAPI, Alexa Fluor 350
<b>WIBA (grün)</b>	460 - 490	515 - 550	eGFP, FITC, Calcein
<b>WG (rot)</b>	510 - 550	> 590	Alexa Fluor 568

### 3.3.4 Zellfärbungen für die Fluoreszenzmikroskopie

Für die Färbung von intrazellulären Organellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern oder dem fluoreszenzmarkierten Concanavalin A in T-Zellen wurden diese fixiert und permeabilisiert. Dafür wurden T-Zellen zweimal mit PBS + 0,1 % BSA gewaschen (300 xg, 5 min, RT) und für die Fixierung in 300 µl 3,7 %igem Paraformaldehyd in PBS für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die T-Zellen zweimal mit PBS + 0,1 % BSA gewaschen (300 xg, 5 min, RT) und für die Permeabilisation für 5 min in 200 µl 0,05 % Triton X-100 in PBS inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden die T-Zellen für die Färbung in 100 µl PBS + 0,1 % BSA aufgenommen und die Färbung mit dem anti-human-

Golgin-Antikörper als erstem und anschließend dem anti-Maus-IgG-Antikörper als zweitem Antikörper durchgeführt. Nach zwei weiteren Waschschrritten wurden die T-Zellen in 8  $\mu$ l PBS + 0,1 % BSA gelöst, in 20  $\mu$ l Mounting-Medium aufgenommen und auf einen Objektträger gegeben. Das Deckgläschen wurde mit Nagellack versiegelt und die Präparate wurden bei 4 °C gelagert.

### 3.3.5 Tube-Formation-Assay

Um den Effekt des gegen den VEGF-Rezeptor gerichteten Immuntoxins VEGF-PE38 auf die Ausformung von Tubes durch HUVEC-Zellen zu untersuchen, wurde ein Tube-Formation-Assay mit  $\mu$ -Slides ( $\mu$ -slide Angiogenesis, ibiTreat; Ibidi GmbH, Planegg, GE) durchgeführt. Hierbei werden die HUVEC-Zellen auf Matrigel, einem Matrix-reichen Produkt, welches aus Engelbrecht-Holm-Swarm-Tumorzellen gewonnen wird, mit Laminin als primärer Komponente, kultiviert. Dadurch wird innerhalb weniger Stunden die Ausbildung von Tubes induziert. Die  $\mu$ -slides wurden nach Angaben des Herstellers mit Matrigel Matrix Growth Factor Reduced gefüllt und pro Well  $2 \times 10^4$  HUVEC Zellen in 100  $\mu$ l EGCM 2 ausgesät. Um den Effekt der Immuntoxin sekretierenden T-Zellen zu untersuchen, wurden diese mit den HUVEC-Zellen kokultiviert. Die Ausbildung von Tubes wurde mit dem Durchlichtmikroskop Olympus IX71 dokumentiert. Für eine genauere Analyse der Tubes und der Vitalität der HUVEC-Zellen wurde eine Calceinfärbung durchgeführt. Dazu wurden die Zellen auf dem Matrigel dreimal mit PBS gespült und mit 6,25  $\mu$ g/ml Calcein in PBS für 30 min bei RT inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrtritt wurde die Calceinfärbung mit dem WIBA Filter des Olympus IX71 analysiert (Tabelle 16). Die Auswertung erfolgte mit der Software ImageJ mit der Anwendung für den Tube-Formation-Assay (Schneider *et al.*, 2012).

### 3.3.6 WST-1-Assay

Der WST-1 (water soluble tetrazolium-1)-Assay kann eingesetzt werden, um die Proliferation oder die Vitalität von Zellkulturen zu bestimmen. Der WST-1-Assay basiert auf der enzymatischen Umsetzung des Tetrazoliumsalses WST-1 zu Formazan mit Hilfe des mitochondrialen Succinat-Tetrazolium-Dehydrogenase-Systems, die photometrisch zu bestimmende Konzentration des Formazans ist damit ein Indikator für die mitochondriale Aktivität der Zellen. Für den WST-1-Assay wurden die zu analysierenden Zellen in Flat-bottom-96-well-Platten ausgesät und in 100  $\mu$ l Zellkulturmedium im CO<sub>2</sub>-Inkubator inkubiert.

Für die Analyse der zytotoxischen Aktivität von T-Zellen wurden die Zielzellen für 16 h inkubiert und dann mit T-Zellen, zellfreiem Kulturüberstand oder Toxin inkubiert. Als Positiv-Kontrolle wurden die Zielzellen mit 1 % Triton-X-100 behandelt. Für die Analyse wurden die Ansätze mit 10 µl der WST-1-Lösung versetzt und nach 2 h die Absorption des Formazans bei 450 nm im ELISA-Reader bei einer Referenzwellenlänge von 620 nm bestimmt. Als Referenz wurde 100 µl Zellkulturmedium verwendet.

### **3.4 Biochemische Assays**

#### **3.4.1 Bradford-Assay**

Mittels Bradford-Assay kann die Proteinkonzentration in Lösungen bestimmt werden (Bradford, 1976). Durch Bildung eines Komplexes des Farbstoffes Brilliant Blue G-250 mit den in Lösung befindlichen Proteinen verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Brilliant Blue G-250 von 465 nm nach 595 nm. Um die Konzentration von Proteinen im Zellysat zu bestimmen, wurde das Bradford Reagenz nach Angaben des Herstellers verwendet und das Absorptionssignal mit dem UV-Vis-Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 595 nm detektiert. Über eine Eichreihe mit BSA wurde die Absorption quantifiziert.

#### **3.4.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese**

Mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine durch Anlegen eines elektrischen Feldes in einer Acrylamidmatrix nach ihrer Größe aufgetrennt. Die Wandereigenschaften der Proteine im elektrischen Feld hängen dabei von Faktoren wie der Größe, Konformation und Ladung der Proteine ab. Bei einer Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen, durch Erhitzung und Zugabe des anionischen Detergenz SDS, wird die Sekundärstruktur der Proteine fast vollständig zerstört wodurch die Eigenladung der Proteine überdeckt wird. Effektiv werden die Proteine also nach der Ladung des assoziierten SDS aufgetrennt, dessen Anteil proportional zur Molmasse des Proteins ist. Für das Polyacrylamidgel wurde Rotiphorese Gel 30 (Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid im Verhältnis 37,5:1) verwendet. 10 %ige Polyacrylamid-Gele dieser Zusammensetzung sind für die Auftrennung von Proteinen von 14 bis 205 kDa geeignet (Tabelle 17). Zur Denaturierung des Proteingemisches wurde dieses in Probenaufgabepuffer (Laemmli, 1970), der als Reduktionsmittel  $\beta$ -Mercaptoethanol enthält, für 1 bis 5 min bei 95 °C erhitzt. Die Auftrennung der Proben erfolgte elektrophoretisch bei einer Spannung von 120 V im

Sammelgel und 160 V im Trenngel. Das Molekulargewicht der Proben wurde durch Verwendung des „Prestained Protein Markers, Broad Range“ bestimmt. Für die Analyse der Proben mittels Massenspektrometrie wurde das Gel bei RT, ÜN mittels „Silver Blue“ Färbung angefärbt (Candiano *et al.*, 2004).

Trenngelpuffer:

1,5 M	Tris/HCl	pH 8,8
0,4 % (w/v)	SDS	

Sammelgelpuffer:

0,5 M	Tris/HCl	pH 6,8
0,4 % (w/v)	SDS	

Gellaufpuffer:

250 mM	Tris/HCl	pH 8,8
1,9 % (w/v)	SDS	
1 % (v/v)	Glycin	

Probenaufgabepuffer (4x):

75 mM	Tris/HCl	pH 6,8
4 % (w/v)	SDS	
20 % (v/v)	Glycerin	
0,02 % (w/v)	Bromphenolblau	
2 % (v/v)	2-Mercaptoethanol	

„Silver Blue“ Färbung:

0,12 % (w/v)	Coomassie Brilliant blue G-250
10 % (v/v)	Phosphorsäure
10 % (w/v)	Ammoniumsulfat
20 % (v/v)	Methanol

**Tabelle 17: Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele**

	Trenngel (10 %)		Sammelgel (3,9 %)	
Rotiphorese Gel 30	10 %	(3,33 ml)	3,9 %	(1,3 ml)
Trenngelpuffer	0,375 M	(2,5 ml)	---	
Sammelgelpuffer	---		0,125 M	(1,25 ml)
Ammoniumperoxidsulfat (10 % w/v)	0,08 %	(80 µl)	0,12 %	(60 µl)
TEMED (99 %)	0,1 %	(10 µl)	0,1 %	(5 µl)
mit H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> auffüllen auf	10 ml		5 ml	

### 3.4.3 Western-Analyse und Immunfärbung

Der Western Blot dient dem spezifischen, immunologischen Nachweis von Proteinen, die mittels SDS-PAGE aufgetrennt wurden. Dafür wurden die im SDS-Gel enthaltenen Proteine elektrophoretisch auf eine in Ethanol getränkte und in Blotpuffer äquilibrierte Polyvinylidenfluorid-Membran übertragen. Aufgrund der hohen Hydrophobizität des Polyvinylidenfluorids binden Proteine dauerhaft über Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen mit der Membran. Das SDS-Gel und die Blottingpapiere wurden ebenfalls in Blotpuffer äquilibriert und der Transfer und die Immobilisierung erfolgten in Blotpuffer mit dem Semi-Dry-Blotter Trans-Blot Semi-Dry (Biorad, München, GE) für 45 min bei 24 V. Zur Kontrolle des Transfers auf die Membran wurden die Proteine mit Ponceau Rot-Lösung angefärbt und die Membran in Quenchpuffer gesättigt um unspezifische Bindungen der Antikörper zu minimieren. Der spezifische Nachweis von Proteinbanden erfolgte mittels Immunfärbung mit einem primären Antikörper, der in TBS + 0,5 % Magermilchpulver, entsprechend der in Tabelle 9 angegebenen Verdünnung, aufgenommen und für 1,5 h bei RT inkubiert wurde. Nach drei Waschschrritten mit Quenchpuffer wurde der entsprechende sekundäre Antikörper, ebenfalls in 1x TBS + 0,5 %igem Magermilchpulver aufgenommen, für 40 min bei RT mit der Membran inkubiert, gefolgt von jeweils drei Waschschrritten mit Quenchpuffer. Für eine kolorimetrische Entwicklung des Blotts wurde Diaminobenzidin nach Angaben des Herstellers frisch angesetzt und der Blot für 15 min bei RT inkubiert. Diaminobenzidin ist ein Substrat der HRP, das nach einer Oxidation durch die an den sekundären Antikörper gekoppelte HRP ein unlösliches, braunes Präzipitat bildet. Die kolorimetrische Dokumentation erfolgte in der E-Box. Für die chemilumineszente Detektion wurde das enhanced ECL-Western Blotting Substrate nach Angaben des Herstellers verwendet. Das ECL-Reagenz Luminol ist ebenfalls ein Substrat der HRP, das nach Oxidation durch die HRP ein bläuliches Licht emittiert. Für die chemilumineszente Detektion wurde der Blot mit der ECL-Lösung benetzt und das Lumineszenzsignal mit dem Chemidoc XRS dokumentiert.

#### Blotpuffer:

47,8 mM	Tris	pH 8,3
38,6 mM	Glycin	
0,037 % (w/v)	SDS	
20 % (v/v)	Methanol	

#### TBS:

0,05% (v/v)	Tween 20 in 1x PBS
-------------	--------------------

Quenchpuffer:

5 % (w/v)	Magermilchpulver in 1x TBS
-----------	----------------------------

Ponceau Rot-Lösung:

10 % (v/v)	Essigsäure
0,5% (w/v)	Ponceau Rot

**3.4.4 Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay**

Der Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) dient dem qualitativen und quantitativen Nachweis von Proteinen in Lösung. Beim Sandwich-ELISA wird das Zielprotein über einen ersten, auf einer Mikrotiterplatte immobilisierten Antikörper gebunden und mittels eines zweiten Antikörpers, der das Zielprotein über ein anderes Epitop bindet, nachgewiesen. Die Detektion erfolgt über einen enzymgekoppelten sekundären Detektions-Antikörper. Das Protokoll für den Nachweis von Immuntoxin im Kulturüberstand von T-Zellen und HEK293-Zellen mittels Sandwich-ELISA wurde unter Verwendung des Immuntoxins VEGF-PE38, das durch T-Zellen sekretierte wurde, etabliert. Dafür wurden  $5 \cdot 10^6$  T-Zellen isoliert, aktiviert und an Tag vier nach der Aktivierung mit 25  $\mu\text{g}$  VEGF-PE38-mRNA transfiziert. Nach 8 h Inkubation wurde der Kulturüberstand zellfrei geerntet, indem das Zellkulturmedium durch Zentrifugation von Zellen und Zelldebris befreit (400 xg, 10 min, 4 °C) und durch nochmalige Zentrifugation (10.000 xg, 10 min, 4 °C) kleinerer Zelldebris und Organellen entfernt wurde. Für das Coaten der 96 well MaxiSorp™ flat-bottom-Platten (Nunc A/S, Roskilde, DK) wurde als erster Antikörper der monoklonale anti-VEGF-Antikörper, gelöst in Coating-Buffer, für 16 h bei 4 °C inkubiert. Nach drei Waschschritten mit jeweils 300  $\mu\text{l}$  Wash-Buffer wurden die Wells für 1 h bei RT mit 200  $\mu\text{l}$  Assay-Diluent-Buffer blockiert und anschließend mit 100  $\mu\text{l}$  zellfreiem Kulturüberstand für 2 h bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen der Wells wurde der ELISA mit dem polyklonalen anti-PEA-Antikörper, gelöst in Assay-Diluent-Buffer für 1 h bei RT inkubiert, dreimal gewaschen und mit dem HRP-konjugiertem, monoklonalen anti-Kaninchen-IgG als Detektions-Antikörper für 1 h bei RT inkubiert. Durch Variationen der Antikörper-Verdünnung wurden die optimalen Konzentrationen und das Verhältnis von erstem zu zweitem Antikörper erarbeitet. Dabei wurde auf ein maximales Signal bei gleichzeitig niedrigem Hintergrundsignal geachtet. Als optimal für den ersten Antikörper erwies sich eine Verdünnung von 1 : 3.000, für den zweiten Antikörper von 1 : 100.000. Der HRP-konjugierte Detektions-Antikörper wurde in einem fixen Verhältnis von 10 : 1 zum zweiten Antikörper verwendet. Als Kontrolle wurde zellfreies Zellkulturmedium verwendet. Nach fünf weiteren Waschschritten wurde die kolorimetrische Detektion des sekundären HRP-Antikörpers mit der TMB-Substrat-Lösung

und der Stop-Lösung durchgeführt. Die Wells wurden mit 100 µl TMB-Substrat-Lösung für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 50 µl Stop-Lösung abgestoppt. Das Signal wurde im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 570 nm ausgelesen. Die chemifluoreszente Detektion wurde mit dem QuantaRed Enhanced Chemifluorescent HRP Substrat durchgeführt. Hierbei wird das Substrat 10-Acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine durch die HRP zu dem Fluoreszenzfarbstoff Resorufin umgesetzt, der ein Excitationsmaximum von ~570 nm und ein Emissionsmaximum von 585 nm hat. Die Entwicklung erfolgte durch Inkubation mit 100 µl QuantaRed Substrat für 5 min bei RT. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 µl Stop-Lösung und 30 sek Schütteln abgestoppt. Das Signal wurde mit dem grünen Filter des Modulus-Fluoreszenzreaders bei einer Exzitationswellenlänge von 525 nm und einer Emissionswellenlänge von 580 - 640 nm detektiert. Die verwendeten Puffer wurden dem Human-IFN- $\gamma$ -ELISA-Set entnommen

### 3.4.5 Massenspektrometrie

Mittels Tandem-Massenspektrometrie ist es möglich, die Aminosäuresequenz von Peptiden zu bestimmen. Bei der MALDI-ToF-Analyse wird die Matrix-unterstützte Tandem Laser-Desorption/-Ionisation mit der Massenspektrometrie und der Analyse der Flugzeit (ToF, time of flight) kombiniert. Die zu untersuchende Proteinlösung wird dafür in die Gasphase überführt und ionisiert. In einem elektronischen Feld beschleunigt, werden die zu analysierenden Ionen nach ihrem Masse-zu-Ladung-Verhältnis  $m/z$  sortiert. Nach einem Cut-off werden die zu analysierenden Peptide durch kollisionsinduzierte Dissoziation fragmentiert und die Fragmente abermals nach ihrem Masse-zu-Ladung-Verhältnis  $m/z$  aufgetrennt. Die MALDI-ToF-Analyse wurde in der vorliegenden Arbeit eingesetzt, um die Sequenz des Immuntoxins VEGF-PE38D auf das Vorhandensein eines N-terminalen ER-Signalpeptids zu untersuchen. Die Aminosäuresequenz des zu analysierenden Proteins wurde mit den Massen der resultierenden Peptide des spezifischen Proteinverdaus abgeglichen. Für den Peptidverdau wurde die Endopeptidase Trypsin verwendet, die Polypeptidketten C-terminal von Arginin und Lysin schneidet, sofern auf diese kein Prolin folgt. Für den Trypsin-Verdau wurde die Bande, die das Immuntoxin enthielt, aus dem SDS-Gel ausgeschnitten und in 10 µl Trypsin-Puffer für 30 min bei 37 °C inkubiert. Für den vollständigen Verdau wurde die Probe mit zusätzlichen 20 µl 10 mM Ammoniumbicarbonat versetzt und bei 37 °C ÜN inkubiert. Der Verdau wurde durch Zugabe von Trifluoressigsäure bei einer Endkonzentration von 0,5 % (v/v) abgestoppt. Die trypsinisierten Peptide wurden mittels „solvent-based-peptide-extraction“ aus dem Gel extrahiert (Shevchenko *et*

*al.*, 1996). Der Verdau und die Lösungs-Fractionen wurden vereint und in der Speedvac Zentrifuge auf circa 20 µl reduziert. Die weitere Reinigung und Aufkonzentration der Proben erfolgte mit C<sub>18</sub> Zip Tip filter Tips (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, GE), die mit Tris-Puffer equilibriert wurden. Die Peptide wurden mit 2 µl Matrix aus den C<sub>18</sub> Zip Tip filter Tips eluiert und direkt auf eine 384 MALDI-Platte (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, GE) aufgetragen. Die Proben wurden im 4800 MALDI-ToF/ToF™ Analyzer analysiert. Für die “*in-silico*”-Analyse wurde die Software Protein Prospector verwendet (Baker & Clauser).

#### Tris-Puffer:

50 mM	Tris-HCl	pH 7,5
1 x	Halt™ Protease Inhibitor Cocktail	
5 mM	EDTA	

#### Trypsin-Puffer:

40 mM	Ammoniumbicarbonat
5 ng/µl	Trypsin, sequencing grade

#### Matrix:

2 mg/ml	α-Cyano-Zimtsäure
50 % (v/v)	Acetonitril
0,05 % (v/v)	Trifluoressigsäure

### 3.5 Statistik

Die Signifikanz der Messwerte wurde mittels Zweistichproben t-Test ermittelt. Die Differenz zweier Daten ist statistisch signifikant, wenn der errechnete *p*-Wert kleiner oder gleich einem gesetzten Wert ist. Die *p*-Werte sind in der vorliegenden Arbeit wie folgt dargestellt:  $p \leq 0,05$ : \*;  $p \leq 0,01$ : \*\*;  $p \leq 0,005$ : \*\*\*. Wurde der *p*-Wert mit  $> 0,05$  bestimmt, so wurde die Differenz zweier Daten als nicht signifikant gewertet und mit n.s. (nicht signifikant) gekennzeichnet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 eGFP-Varianten für die Expression in T-Zellen und HEK293-Zellen

#### 4.1.1 Konstruktion der Expressionsvektoren für die eGFP-Varianten

Als Modellprotein für die Etablierung eines Elektroporationsprotokolls für die Transfektion von rekombinanten Immuntoxinen wurde das enhanced Grün Fluoreszierende Protein (eGFP) eingesetzt. Das eGFP, eine optimierte Variante des Grün Fluoreszierenden Proteins, das erstmals 1962 aus der Qualle *Aequorea victoria* isoliert wurde (Shimomura *et al.*, 1962). Das Protein besteht aus 238 Aminosäuren bei einem Molekulargewicht von 26,9 kDa. Die im Vergleich zu GFP erhöhte Fluoreszenzintensität weist ein Absorptionsmaximum bei 488 nm und ein Emissionsmaximum bei 509 nm auf (Cormack *et al.*, 1996). Aufgrund seiner Fluoreszenzeigenschaften eignet sich das eGFP als Modellprotein, da diese eine einfache, nicht invasive Analyse der Expression und Lokalisation des rekombinanten Proteins in den transient transfizierten Zellen ermöglichen.

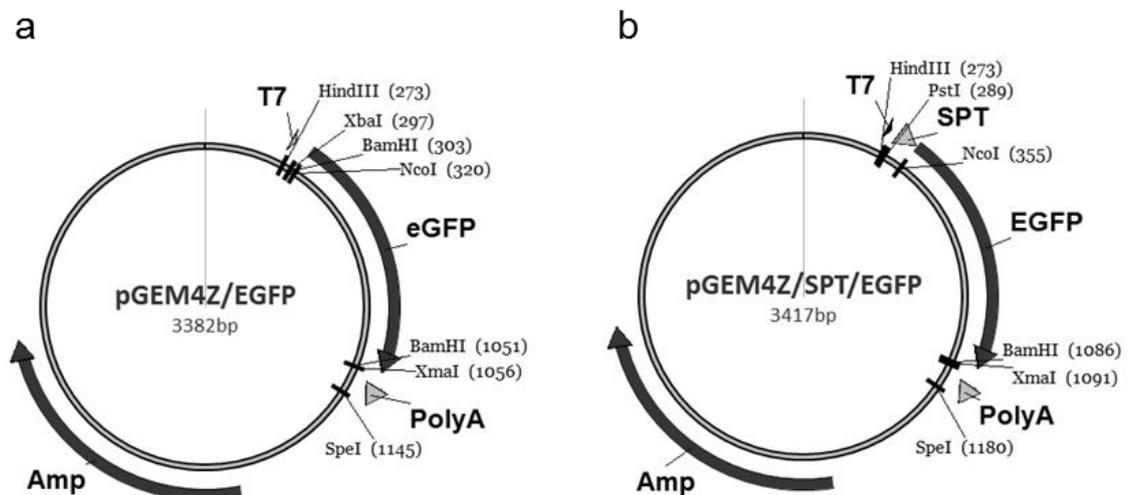
Die Gensequenz des eGFP wurde mittels restriktionsenzymatischem Doppelverdau mit BamHI aus dem Vektor pGEM4Z/EGFP ausgeschnitten und mittels Ligation in den Expressionsvektor pGEM-4Z/A64 eingefügt (Tabelle 4). Der Expressionsvektor pGEM-4Z/A64 kodiert für den T7-Promotor, über den die T7-Polymerase die Transkription initiiert, sowie für eine 64 Aminosäure lange Poly(A)-Sequenz kodiert, welche die *in vivo* - Polyadenylierung der mRNA durch die Poly(A)-Polymerase ersetzt und dadurch die mRNA unter anderem vor Abbau schützt. Der resultierende Expressionsvektor wurde pGEM-4Z/EGFP/A64 benannt (Tabelle 5). Um die eGFP-Translokation in das ER der transfizierten Zellen zu initiieren, wurden der eGFP-Sequenz jeweils die Sequenz der ER-Signalpeptide von Interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), von Interleukin-2 (IL-2) und vom Transformierenden Wachstumsfaktor- $\beta$ 2 (TGF- $\beta$ -2) N-terminal vorangestellt. Die drei humanen ER-Signalpeptide sind mit circa 20 Aminosäuren relativ kurz und es konnte jeweils gezeigt werden, dass sie die Translokation in das ER initiieren können (Tabelle 18). Die Wahrscheinlichkeit, mit der bei dem rekombinanten Zusammenfügen der ER-Signalpeptid-Sequenzen und der eGFP-Sequenz eine Signalpeptid-Spaltstelle für die Signalpeptidase entstand, wurde theoretisch mit der Software SignalP 4.0 überprüft (Petersen *et al.*, 2011). Berechnungen ergaben für

das Anfügen von SP(i) und SP(ii) eine potentielle Spaltstelle. Für das Anfügen von SP(t) wurde nach dem Anfügen eines Isoleucins an das Signalpeptid eine Spaltstelle vorausgesagt, weshalb das gemacht wurde. Die Oligonukleotide wurden hybridisiert, mittels Verdau mit den Restriktionsenzymen PstI und NcoI geschnitten und durch Ligation in den Expressionsvektor pGEM-4Z/EGFP/A64 eingefügt. Die resultierenden Expressionsvektoren wurden pGEM-4Z-SP(i)-EGFP-A64, pGEM-4Z-SP(ii)-EGFP-A64 und pGEM-4Z-SP(t)-EGFP-A64 benannt (Tabelle 4).

**Tabelle 18: ER-Signalpeptide.** In der vorliegenden Arbeit verwendete Abkürzungen, Aminosäuresequenzen und Identifikation (ID), wie sie in der Signal Peptide Database angegeben sind

Signal-peptid	Protein	Aminosäure-Sequenz	Aminosäuren	ID
SP(i)	humanes IFN $\gamma$	MKYTSYILAFQLCIVLGS LGCYC	23	19505
SP(ii)	humanes IL-2	MYRMQLLSCIALSLALVTNS	20	24650
SP(t)	humanes TGF- $\beta$ -2	MHYCVLSAFLILHLVTVAL	19	20955
SP(v)	humanes VEGF	MNFLLSWVHW SLALLLYLHH AKWSQA	26	-

Mittels Agarosegelelektrophorese und Sequenzierung durch MWG-Operon wurden die Sequenzen der Zwischen- und Endprodukte der Klonierungen kontrolliert, wobei die Sequenz-Analyse mit der Software Vector NTI Advance<sup>®</sup> 11.5 erfolgte. Abbildung 5 zeigt die Vektorkarte für den Expressionsvektor pGEM4Z/EGFP (Abbildung 5 a) und die Vektorkarte für das eGFP, dem das ER-Signalpeptid von TGF- $\beta$ -2 vorangestellt ist (Abbildung 5 b).



**Abbildung 5: Schematische Darstellung zweier als Template für die *in vitro*-mRNA-Synthese verwendeten Vektoren.** Die pGEM-4Z-Vektoren kodieren jeweils für einen T7-Promotor (T7), eine 64 Adenin-Nukleotide umfassende Poly(A)-Sequenz und ein Amp-Resistenzgen (Amp). **(a)** Vektor pGEM4Z/EGFP kodiert für eGFP, das nach der Expression im Zytoplasma verbleibt. **(b)** Vektor pGEM4Z/SP(i)/EGFP kodiert für eGFP, dem das Signalpeptid SP(t) vorangestellt ist, das die Translokation in das ER initiiert. **(a, b)** Eingezeichnet sind die Schnittstellen der Restriktionsenzyme XmaI und SpeI für die Linearisierung der Vektoren und XbaI, NcoI und BamHI für die Klonierung.

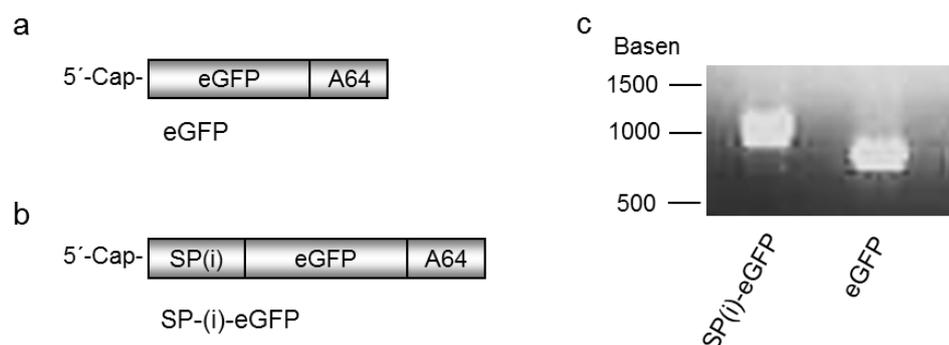
## 4.1.2 Transiente Transfektion von T-Zellen mit eGFP-mRNA

### 4.1.2.1 Transfektion von T-Zellen mit SP(i)-eGFP mRNA

Bei der transienten Transfektion liegt, im Unterschied zur stabilen Transfektion, die kodierende Nukleinsäure nur temporär in der Zelle vor und wird nicht in das Genom der Zielzelle eingebaut. Neben DNA oder viralen Vektoren kann auch mRNA transient transfiziert werden. Die Verwendung von mRNA für die transiente Transfektion bietet die Vorteile, dass die Transfektionseffizienz in der Regel höher ist und dass die Vitalität der transfizierten Zellen weniger stark beeinträchtigt ist als beim Einsatz von Plasmid-DNA (Zhao *et al.*, 2011). Zudem besteht bei der Verwendung von mRNA nicht die Gefahr, dass sich Nukleotid-Fragmente in zelleigene Gene oder nicht kodierende Bereiche integrieren, was zu unerwünschter Genexpression im Zielorganismus führen kann. Außerdem lässt sich durch den Einsatz von mRNA das Risiko einer Vektor-vermittelten Immunogenität vermeiden (Smits *et al.*, 2004). Deshalb ist die Transfektion von mRNA eine sichere, hoch effiziente und klinisch unbedenkliche Methode. Ein weiterer Vorteil gegenüber der Verwendung von Plasmiden ist die zeitlich schneller erfolgende Etablierung von Immuntoxin exprimierenden T-Zellen, deren Expression bereits wenige Minuten nach der Transfektion einsetzt (Zhao *et al.*, 2006, Schaft *et al.*, 2006). Ein Nachteil der mRNA-vermittelten,

transienten Genexpression ist deren kurze Dauer, da die mRNA meist nur wenige Stunden in der Zelle vorliegt, bis sie abgebaut wird (Schaft *et al.*, 2006). Diese Tatsache kann aber auch als Vorteil genutzt werden, um eine zeitlich begrenzte Genexpression zu initiieren. In der vorliegenden Arbeit sollten therapeutische T-Zellen entwickelt werden, bei denen mittels einer möglichst effizienten und schonenden, transienten Transfektion eine zeitlich begrenzte Expression von Immuntoxinen initiiert werden kann.

Eine erfolgreiche Elektroporation von T-Zellen mit mRNA konnte von Zhao *et al.* (2006) gezeigt werden. Die Elektroporation von Lymphozyten des peripheren Bluts (*peripheral blood lymphocytes*, PBLs), gewonnen aus Melanom-Patienten, mit eGFP-kodierender mRNA führte zu einer eGFP-Expression in mehr als 90 % der transfizierten Zellen, allerdings bei einer Reduktion der Vitalität auf circa 80 % (Zhao *et al.*, 2006). eGFP eignet sich als Modellprotein für die Erstellung eines Protokolls zur transienten Transfektion von primären, aktivierten T-Zellen mit mRNA, da es kaum toxisch für eukaryotische Zellen ist und aufgrund seiner Fluoreszenzeigenschaft leicht nachzuweisen ist. Die Plasmide pGEM4Z/EGFP/A64 und pGEM4Z/SP(i)/EGFP/A64 (Tabelle 5) wurden als Template für die *in vitro*-Synthese der eGFP-kodierenden mRNA verwendet (Abbildung 6).



**Abbildung 6: Schematische Darstellung von eGFP-mRNA und SP(i)-eGFP-mRNA. (a)** *In vitro* translatierte mRNA, die für eGFP kodiert. **(b)** *In vitro* translatierte mRNA, die für eGFP kodiert, und deren Sequenz für die Translokation in das ER ein Signalpeptid von IFN $\gamma$  vorangestellt ist. **(c)** Analyse von Immuntoxin-kodierender mRNA im 1,2 %igen denaturierenden Agarosegel.

Für die Entwicklung von „therapeutischen“ T-Zellen ist die Vitalität der transfizierten T-Zellen von großer Bedeutung, da die Zellen weiterhin in der Lage sein müssen, zum Tumor zu migrieren und den T-Zell-Effekt auszuüben. Gleichzeitig soll ein möglichst großer Anteil der T-Zellen mit der mRNA transfiziert sein, damit das Potential der T-Zellen zur Syntese des rekombinanten Proteins vollständig ausgenutzt werden kann. Deshalb wurden die Transfektionsparameter auf maximale Expression von rekombinantem Protein bei gleichzeitig minimal beeinträchtigter Vitalität der T-Zellen hin optimiert.

Bei der Elektroporation werden die zu transfizierenden Zellen einem elektrischen Feld ( $E$ ) ausgesetzt. Das elektrische Feld induziert eine Änderung des Transmembranpotentials über die Zellmembran. Es ist proportional zur angelegten elektrischen Spannung ( $U$ ) und reziprok proportional zum Elektrodenabstand ( $d$ ), daher gilt:

$$E = \frac{U}{d} \quad [3]$$

Das Prinzip der Elektroporation beruht auf einer Veränderung des Transmembranpotentials ( $V_m$ ) durch das Anlegen eines elektrischen Feldes über eine Zelle und wird durch folgende Gleichung beschrieben:

$$\Delta V_m = f E_{\text{ext}} r \cos \phi \quad [4]$$

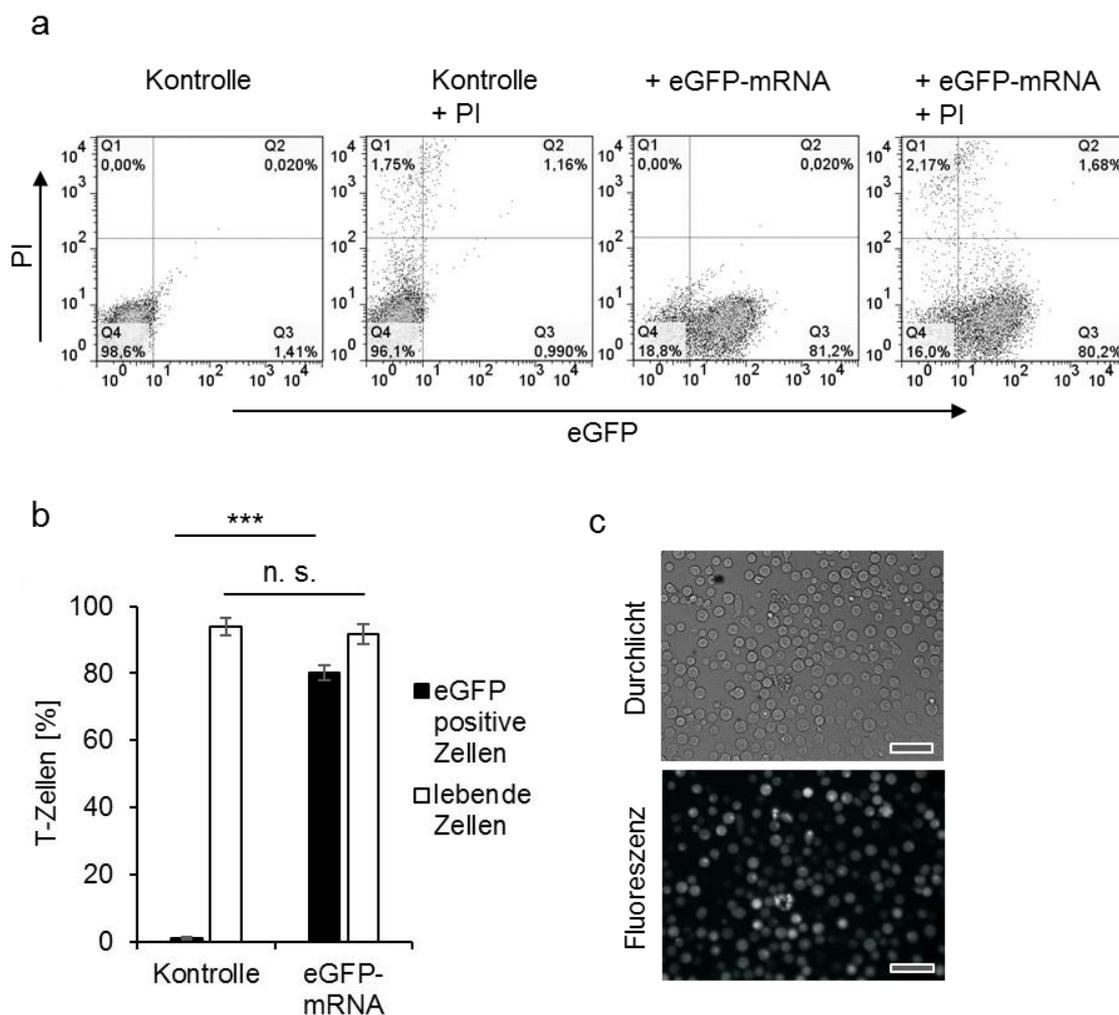
Hierbei beschreibt  $f E_{\text{ext}}$  das angelegte elektrische Feld,  $r$  den Radius der Zelle und  $\phi$  den Winkel zu dem extern angelegten, elektrischen Feld. Ist die transmembrane Spannung höher als die Kapazität der Zellmembran, die üblicherweise bei 200 mV liegt, so bricht das Transmembranpotential kurzzeitig zusammen, die Membranintegrität wird lokal zerstört und durch den Einstrom von Wasser werden hydrophile Poren gebildet, durch die Moleküle in die Zelle einströmen können (Holtkamp *et al.*, 2006). Um die Transfektion von T-Zellen zu optimieren, wurden die Parameter Elektrodenabstand, Pulsdauer und elektrische Spannung variiert.

Für die Transfektion der T-Zellen wurden diese aus Buffy Coats isoliert, aktiviert und an Tag drei nach der Aktivierung mit unterschiedlichen Mengen SP(i)-eGFP-mRNA unter den oben genannten Variationen der Elektroporationsparametern transfiziert. Der Anteil eGFP-positiver T-Zellen und die eGFP-Intensität wurden im Durchflusszytometer analysiert (Abbildung 7 a). Für die Analyse der Vitalität wurde parallel eine PI-Färbung durchgeführt und ebenfalls im Durchflusszytometer analysiert.

**Tabelle 19: Standardparameter für die mRNA-Transfektion von T-Zellen**

Parameter	Wert*
Elektrodenabstand ( $d$ )	4 mm
Elektrische Spannung ( $U$ )	500 V
Impulsdauer	800 ms

\* Bei der Elektroporation war zu beachten, dass die realen Werte von den beim BTX 830 Elektroporator eingegebenen Werten abwichen. Wurden die in Tabelle 19 dargestellten Einstellungen gewählt, betrug der reale Wert für die elektrische Spannung 489 V bei einer Impulsdauer von 803 ms.



**Abbildung 7: Effizienz der Transfektion von T-Zellen mit SP(i)-eGFP-mRNA.**  $5 \times 10^6$  T-Zellen wurden mit  $25 \mu\text{g}$  SP(i)-eGFP-mRNA transfiziert und der Anteil an eGFP-exprimierenden T-Zellen 24 h nach der Transfektion bestimmt. **(a)** FACS-Analyse von nicht transfizierten T-Zellen ohne und mit PI-Färbung und von mit SP(i)-eGFP-mRNA transfizierten T-Zellen ohne und mit PI-Färbung. **(b)** Anteil der eGFP-positiven T-Zellen und deren Vitalität nach einer PI-Färbung. Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  s.d. von fünf unabhängigen Versuchen, durchgeführt in Duplikaten. Sternchen repräsentieren die statistische Signifikanz ( $p \leq 0,005$ : \*\*\*). **(c)** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der T-Zellen 4 h nach der Transfektion. Objektiv: 20 x, Maßstab:  $50 \mu\text{m}$ . [Abbildung modifiziert nach Eggers *et al.*, 2018].

Für die Auswertung wurden nicht transfizierte Zellen (Q4) als Kontrolle definiert. Daraus ergab sich, dass die Zellen in Q1 und Q2 als PI-positiv und die Zellen in Q3 als eGFP-positiv gewertet wurden. Der Anteil der eGFP-positiven Zellen wurde innerhalb der lebenden, also PI-negativen, Zellen nach folgender Formel berechnet:

$$\text{eGFP-positiv T-Zellen} = \frac{100}{(Q4+Q3)} \times Q3 \quad [2]$$

Die Transfektion von T-Zellen mit eGFP führte zu einem deutlich erhöhten Fluoreszenzsignal im FL1-H-Kanal, aber auch bei einer Transfektion mit den Parametern aus Tabelle

19 beim Einsatz von 25 µg SP(i)-eGFP-mRNA war keine Abgrenzung zu der Population der eGFP-negativen T-Zellen möglich (Abbildung 7 a).

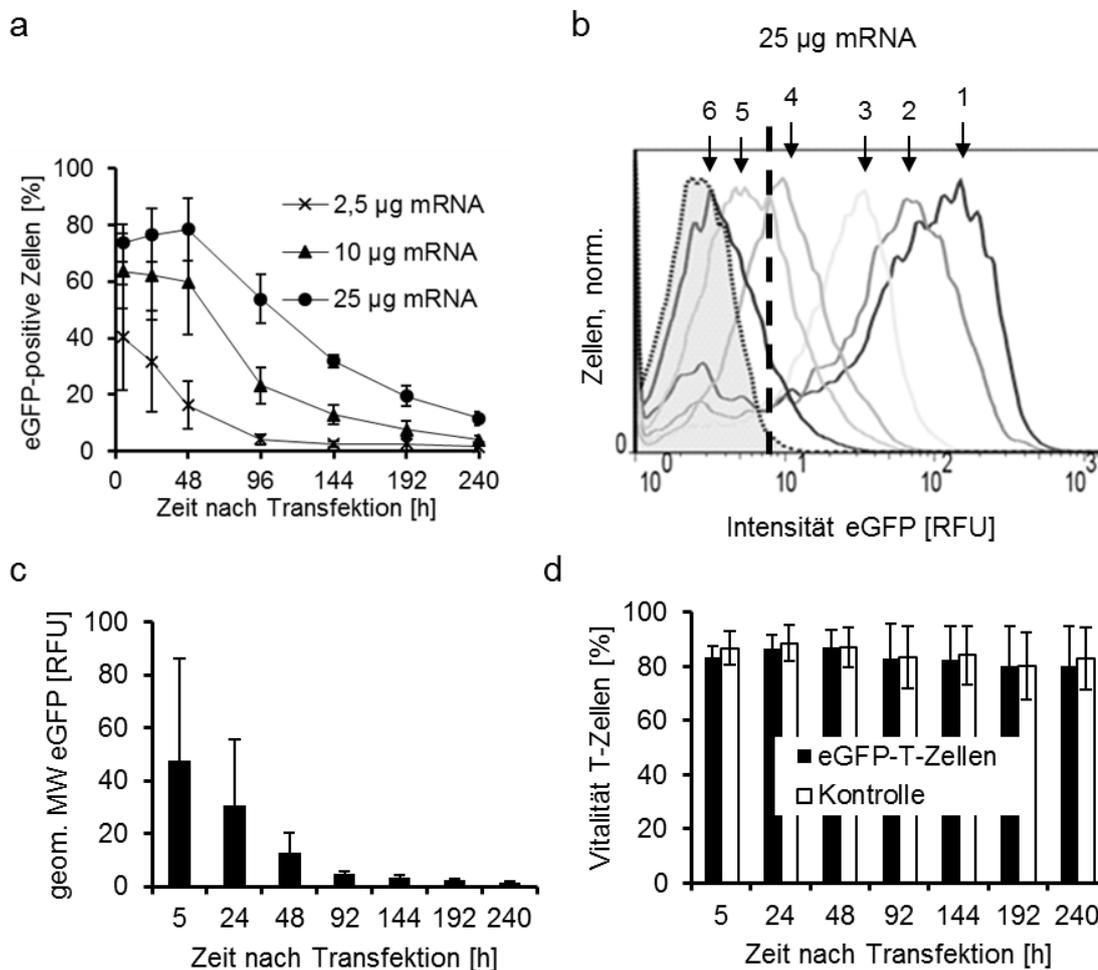
Mittels Transfektion in einer 4 mm Küvette, unter Einsatz eines einzelnen 800 µs langen Pulses von 500 V, konnte für aktivierte T-Zellen, die mit 25 µg SP(i)-eGFP-mRNA transfiziert wurden, 24 h nach der Transfektion ein Anteil von  $80,5 \pm 2,2$  % eGFP-positiver Zellen erreicht werden. Dabei war die mittels PI-Färbung bestimmte Vitalität nicht signifikant vermindert (Abbildung 7 b). Auch mittels Fluoreszenzmikroskopie konnte bestätigt werden, dass 5 h nach der Transfektion der Großteil der T-Zellen eGFP-positiv war (Abbildung 7 c). Die Transfektion von T-Zellen wurde zusätzlich mit dem Amaxa Nucleofector II unter Verwendung des Programms T-23, das für die schonende Elektroporation von T-Zellen konzipiert wurde, durchgeführt. Die Transfektion von 10 µg SP(i)-eGFP führte zu einem stark erhöhten absoluten Fluoreszenzsignal der eGFP-positiven T-Zellen und der geometrische Mittelwert war 5 h nach der Transfektion gegenüber den mit dem oben beschriebenen Protokoll transfizierten T-Zellen um den Faktor fünf erhöht. Allerdings war die Vitalität mit 67 % stark beeinträchtigt (Daten nicht gezeigt). Eine erhöhte Expression von rekombinantem Protein konnte nur bei gleichzeitig stark beeinträchtigter Vitalität der T-Zellen erreicht werden.

Zudem konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung des elektrischen Feldes durch Erhöhung der elektrischen Spannung in 100 V-Schritten bis auf 1000 V zu einer Erhöhung der Transfektionseffizienz führte. Allerdings ebenfalls bei beeinträchtigter Vitalität der T-Zellen (Daten nicht gezeigt). Auch durch eine Erhöhung der Impulsdauer von 500 ms - 1000 ms konnte die Transfektionseffizienz jeweils erhöht werden (Daten nicht gezeigt). Bei einem Elektrodenabstand von 4 mm und einer Spannung von 500 Volt konnte bei einer Impulsdauer von 800 µs  $80,5 \pm 2,2$  % eGFP-positive T-Zellen, deren Vitalität nicht beeinträchtigt war, erreicht werden (Abbildung 7 b). Als optimal erwies sich demnach eine Transfektion mit dem BTX 830 Elektroporator, mit den in Tabelle 19 dargestellten Parametern, bei denen keine signifikante Verminderung der Vitalität gemessen wurde.

#### **4.1.2.2 Zeitlicher Verlauf der eGFP-Expression in T-Zellen**

Um den zeitlichen Verlauf der Expression von eGFP in T-Zellen und die längerfristigen Auswirkungen der Transfektion und eGFP-Expression auf die Vitalität der Zellen zu untersuchen, wurden primäre T-Zellen an Tag vier nach der Aktivierung mit unterschiedlichen Mengen SP(i)-eGFP-mRNA transfiziert. Über die Variation der Menge der für die Transfektion eingesetzten mRNA sollte die Abhängigkeit der Expression von der Menge der mRNA untersucht werden. Die transfizierten T-Zellen wurden über einen

Zeitraum von zehn Tagen kultiviert und die eGFP-Expression sowie die Vitalität der Zellen mittels PI-Färbung und Durchflusszytometrie bestimmt.



**Abbildung 8: Zeitlicher Verlauf der Expression von eGFP und Abhängigkeit von der Menge an transfizierter mRNA in T-Zellen.**  $5 \times 10^6$  T-Zellen wurden mit 2,5 µg, 10 µg und 25 µg SP(i)-eGFP-mRNA transfiziert und die eGFP-Expression zu den angegebenen Zeitpunkten mittels Durchflusszytometrie analysiert. **(a)** Anteil der eGFP-positiven Zellen an der Gesamtlebendzellzahl. **(b)** Histogramm des eGFP-Signals von mit 25 µg SP(i)-eGFP-mRNA transfizierten T-Zellen 5 h (1), 24 h (2), 48 h (3), 96 h (4), 144 h (6) und 240 h (7) nach der Transfektion. Kontrolle nach 240 h ist grau unterlegt. **(c)** Geometrischer Mittelwert der eGFP-positiven T-Zellen, transfiziert mit 25 µg SP(i)-eGFP-mRNA. **(d)** Vitalität der mit 25 µg SP(i)-eGFP-mRNA transfizierten T-Zellen, PI-Färbung. **(a, b, c, d)** Nicht transfizierte T-Zellen wurden als Kontrolle verwendet. Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  s.d. von drei unabhängigen Versuchen, durchgeführt in Duplikaten.

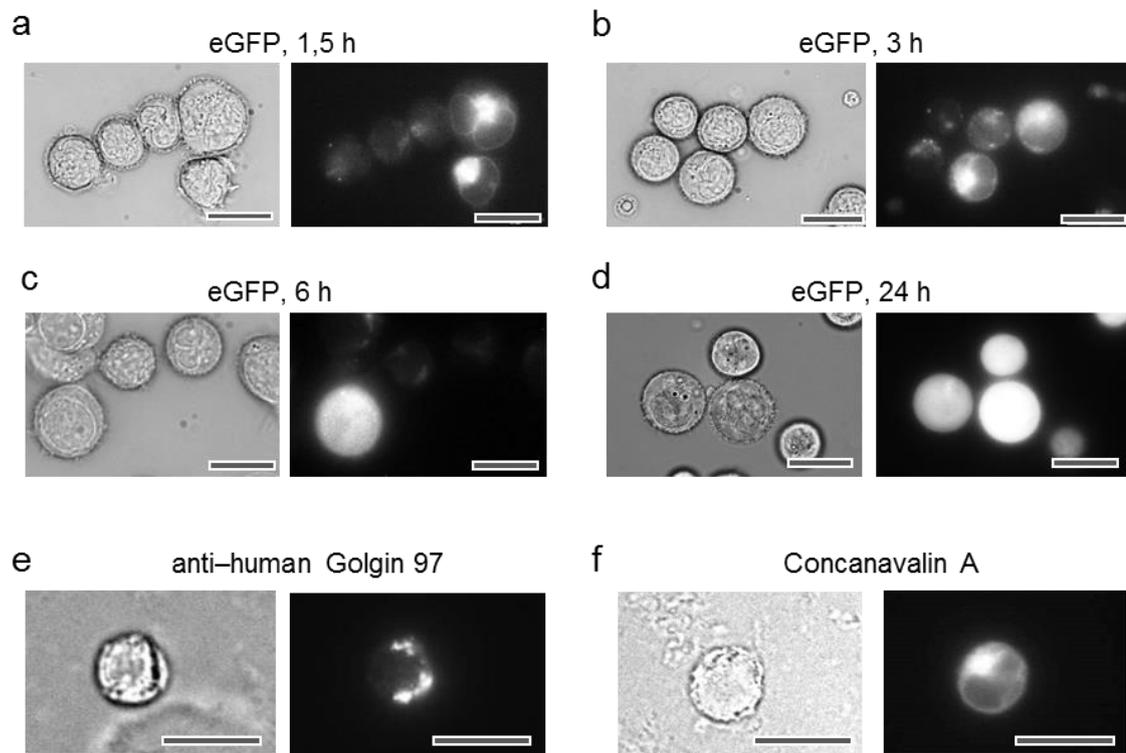
Der Anteil an eGFP-positiven T-Zellen transfiziert mit 25 µg SP(i)-eGFP-mRNA erreichte bereits 5 h nach der Transfektion einen Wert von  $73,7 \pm 6,6$  %. Der Anteil an eGFP-positiven T-Zellen blieb bis 48 h nach der Transfektion mit  $78,6 \pm 11,1$  % konstant hoch und sank dann langsam ab (Abbildung 8 a). Bei einer Transfektion von 25 µg SP(i)-eGFP-mRNA konnte zehn Tage nach der Transfektion ebenfalls ein geringes eGFP-Signal in den T-Zellen detektiert werden (Abbildung 8 b). In Abbildung 8 c ist zu erkennen, dass

die Intensität des eGFP-Signals direkt nach der Transfektion am höchsten war und dieses im Unterschied zum Anteil eGFP-positiver T-Zellen schon während der ersten 48 h konstant abnahm. Im Laufe der folgenden zehn Tage nahm die Intensität des eGFP-Signals kontinuierlich ab (Abbildung 8 b, c). Der geometrische Mittelwert des eGFP-Signals war auch für die hier dargestellten 25 µg SP(i)-eGFP-mRNA nach 5 h maximal und nahm dann konstant ab (Abbildung 8 c). Eine Studie von Smits *et al.* (2004) zeigte für T-Zellen, die mit eGFP-mRNA transfiziert waren, erst nach zwei Tagen eine Abnahme der Intensität des eGFP-Signals; nach vier Tagen lag diese noch bei  $57 \pm 19 \%$ . Der Anteil der eGFP-positiven T-Zellen blieb über einen Zeitraum von mindestens sieben Tagen stabil (Smits *et al.*, 2004). Dass der Anteil der eGFP-positiven T-Zellen in der vorliegenden Arbeit deutlich früher abnahm, ist eventuell auf die Sekretion von eGFP zurückzuführen.

Die Analyse der Intensität des Fluoreszenzsignals zeigt ebenfalls eine Abhängigkeit der eGFP-Expression von der Menge der transfizierten SP(i)-eGFP-mRNA. Je mehr SP(i)-eGFP-mRNA für die Transfektion der T-Zellen eingesetzt wurde, desto höher war der Anteil der eGFP-positiven Zellen (Abbildung 8 a). Eine Erhöhung der mRNA-Menge von 25 µg auf 40 µg SP(i)-eGFP-mRNA führte nur zu einer geringen Erhöhung der Transfektionseffizienz (Daten nicht gezeigt). Der Zusammenhang zwischen der Menge der eingesetzten mRNA und der Menge an exprimiertem eGFP war nicht linear, es schien einen Sättigungseffekt zu geben. Eine weitere Erhöhung der Expression durch Erhöhung der Menge der mRNA erschien deshalb nicht sinnvoll. Die Vitalität der T-Zellen, die nach transienter Transfektion das Modellprotein eGFP exprimierten, war über einen Zeitraum von zehn Tagen gegenüber der Vitalität der nicht transfizierten T-Zellen nicht beeinträchtigt. Sie lag konstant bei circa 90 %, zeigte aber üblicherweise einen leichten Einbruch direkt nach der Transfektion (Abbildung 8 d). Dies galt für die maximale Menge von 25 µg transfizierter mRNA, aber auch bei geringeren Mengen mRNA war keine Beeinträchtigung zu beobachten. Versuche mit nicht optimiertem Transfektionsprotokoll zeigten, dass die Vitalität in Abhängigkeit von der Menge der eingesetzten mRNA beeinträchtigt sein konnte. Mit einem Gating der nicht aktivierten T-Zellen im FSC / SSC von mit 25 µg SP(i)-eGFP-mRNA transfizierten T-Zellen, 24 h nach der Transfektion, konnte gezeigt werden, dass die nicht aktivierten T-Zellen nur zu einem sehr geringen Anteil eGFP-positiv waren (Daten nicht gezeigt). Demnach läge der Anteil an eGFP-positiven aktivierten T-Zellen höher als die in Abbildung 7 dargestellten 80 %.

Die eGFP-Lokalisation in transfizierten T-Zellen wurde außerdem im zeitlichen Verlauf analysiert. Dazu wurden T-Zellen an Tag drei nach der Aktivierung mit 10 µg SP(i)-eGFP-mRNA transfiziert und die Lokalisation des rekombinanten eGFP in den Zellen über einen Zeitraum von 24 h mittels Lebendzellmikroskopie im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Um die subzelluläre Lokalisation, in der das eGFP in den T-Zellen lokalisiert war, zu

analysieren, wurden Fluoreszenzfärbungen des ER und des Golgi-Apparates in nicht transfizierten T-Zellen durchgeführt und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert.



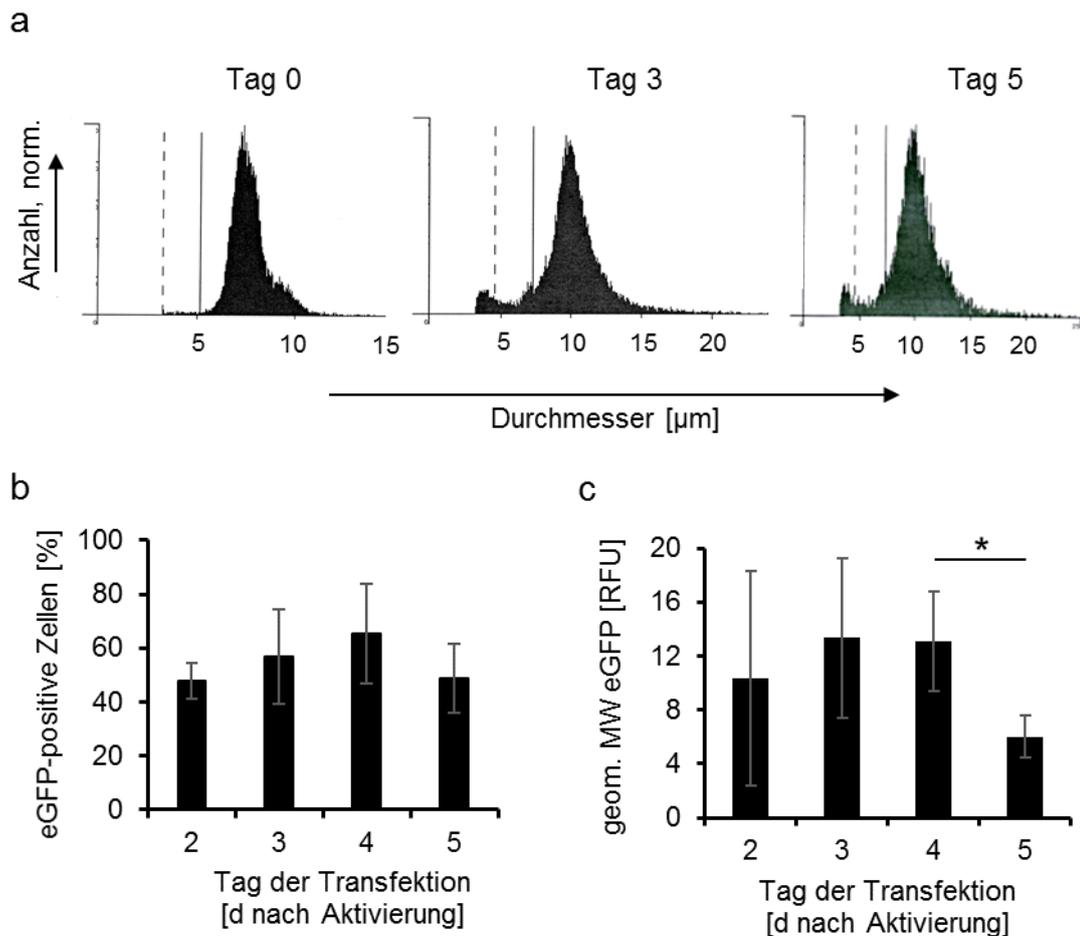
**Abbildung 9: Zeitlicher Verlauf der Lokalisation von eGFP in T-Zellen transfiziert mit SP(i)-eGFP-mRNA.**  $5 \times 10^6$  T-Zellen wurden mit  $25 \mu\text{g}$  SP(i)-eGFP-mRNA transfiziert. **(a - d)** 1,5 h, 3 h, 6 h und 24 h nach der Transfektion wurde die eGFP-Lokalisation im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Objektiv: 60 x, Maßstab:  $20 \mu\text{m}$ . **(e)** Antikörperfärbung des Golgi-Apparates von T-Zellen mit dem anti-human-Golgin-Antikörper, im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Objektiv: 60 x, Maßstab:  $20 \mu\text{m}$ . **(f)** Färbung des ER von T-Zellen mit Concanavalin A, im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Objektiv: 60 x, Maßstab:  $20 \mu\text{m}$ .

Das Fluoreszenzsignal von endogenem eGFP, dessen Translokation in das ER durch das Signalpeptid von IFN $\gamma$  initiiert wurde, konnte schon 1,5 h nach der Transfektion der T-Zellen mit SP(i)-eGFP-mRNA fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden (Abbildung 9 a). Daher kann angenommen werden, dass die Expression der mRNA direkt nach der Transfektion einsetzte. Die Bilder der Fluoreszenzmikroskopie zeigten, dass das eGFP 1,5 h und 3 h nach der Transfektion in den T-Zellen in Strukturen lokalisiert war (Abbildungen 9 a und b), die ebenfalls mittels Färbung des Golgi-Apparates und des ER angefärbt werden konnten (Abbildungen 9 e und f). Es kann somit davon ausgegangen werden, dass das eGFP in das ER der T-Zellen transportiert wurde. Dagegen konnte das eGFP 6 h und 24 h nach der Transfektion kaum oder nicht mehr in Strukturen des ER und des Golgi-Apparates lokalisiert werden (Abbildungen 9 c und d). Zu diesen Zeitpunkten war das eGFP-Signal in der gesamten Zelle zu detektieren.

#### 4.1.2.3 Effizienz der transienten Transfektion in Abhängigkeit vom Aktivierungsstatus der T-Zellen

Die Aktivierung von T-Zellen ist auch für die Effizienz der Transfektion von Bedeutung. Für PBMCs, die mit Phytohämagglutinin oder alternativ über eine Kokultur mit einer EBV-transformierten autologen B-Zelllinie aktiviert wurden, konnte eine effizientere mRNA-basierte Genexpression als für nicht aktivierte Zellen gezeigt werden. Aktivierte PBMCs, die mit eGFP-kodierender mRNA elektroporiert wurden, waren nach 24 h im Unterschied zu nicht aktivierten PBMCs, die zu 0,7 % eGFP-positiv waren, zu 46,5 % eGFP-positiv (Smits *et al.*, 2004). In einer weiteren Studie, konnte für T-Zellen, die für 48 - 96 h mit anti-CD3-Antikörpern stimuliert wurden, nach einer Transfektion mit eGFP-kodierendem Plasmid ein Anteil von 60 - 70 % eGFP-positiver Zellen gezeigt werden. Nicht aktivierte T-Zellen konnten nicht oder nur zu einem geringen Anteil transfiziert werden (Mitchell *et al.*, 2008). Die Aktivierung von T-Zellen erfolgte in der vorliegenden Arbeit mit dem T cell Activation/Expansion Kit, bei dem an Beads gekoppelte anti-CD3-, anti-CD2- und anti-CD8-Antikörper eine *in vitro*-Aktivierung induzieren.

Um den Einfluss des Aktivierungsstatus der T-Zellen auf den Anteil der transfizierten T-Zellen und die Intensität des eGFP-Signals zu untersuchen, wurden T-Zellen an verschiedenen Tagen nach der Aktivierung mit SP(i)-eGFP-mRNA transfiziert. Bei T-Zellen, die schon an Tag zwei transfiziert wurden, wurden die Anti-Biotin MACSiBeads an Tag zwei, anstatt wie üblich an Tag drei, entfernt. Da die Aktivierung der T-Zellen unter anderem zu einer Zunahme des Zelldurchmessers führte, wurde die Aktivierung über die Messung desselben im CASY-Cell Counter kontrolliert. Die Effektivität der Transfektion wurde mittels Durchflusssytometrie untersucht.



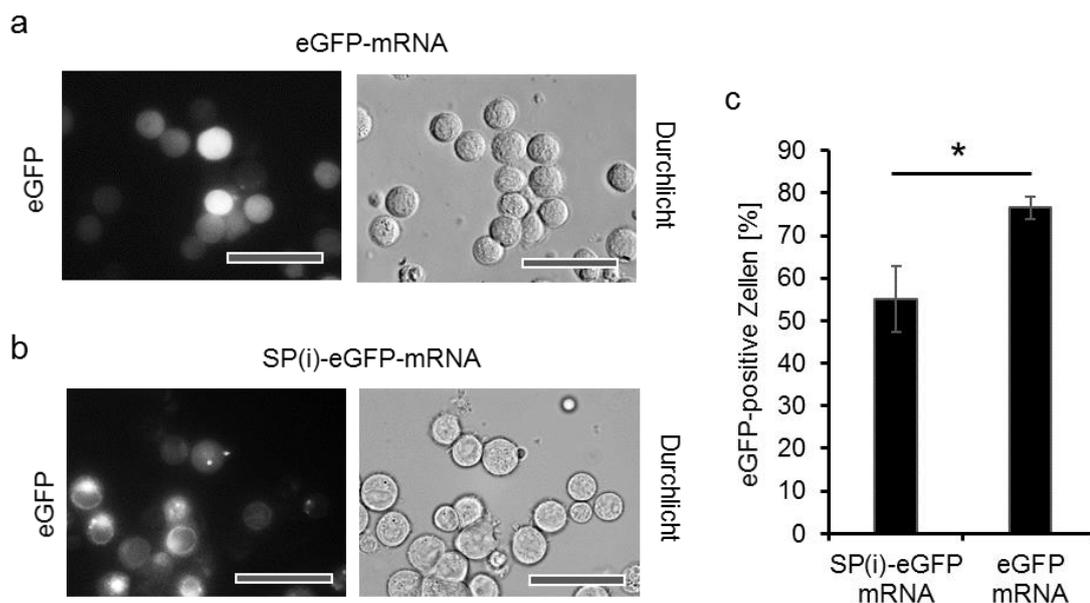
**Abbildung 10: Expression von eGFP in Abhängigkeit vom Aktivierungsstatus der T-Zellen.** (a) Durchmesser von humanen T-Zellen vor und nach der Aktivierung, exemplarische Messungen. (b, c)  $5 \times 10^6$  T-Zellen wurden an Tag zwei, drei, vier und fünf nach der Aktivierung mit  $10 \mu\text{g}$  SP(i)-eGFP-mRNA transfiziert. Jeweils 24 h nach der Transfektion wurde die eGFP-Expression im FACS bestimmt. (b) Der Anteil der eGFP-positiven T-Zellen an der Gesamtlebendzellzahl in Abhängigkeit vom Tag der Transfektion. (c) Der geometrische Mittelwert der eGFP-positiven T-Zellen in Abhängigkeit vom Tag der Transfektion. (b, c) Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  s.d. von drei unabhängigen Versuchen, durchgeführt in Duplikaten. Ausnahme ist der Wert für Tag zwei mit zwei unabhängigen Versuchen. Sternchen repräsentieren die statistische Signifikanz ( $p \leq 0,05$ : \*).

Die Messungen mit dem CASY-Cell Counter zeigten einen mittleren Zelldurchmesser von frisch isolierten, naiven, nicht aktivierten T-Zellen von  $7,67 \pm 0,11 \mu\text{m}$ . An Tag drei nach der Aktivierung war dieser auf  $10,8 \pm 0,1 \mu\text{m}$  und an Tag fünf nach der Aktivierung auf  $11,1 \pm 0,12 \mu\text{m}$  angestiegen (Abbildung 10 a). Die Werte wurden aus jeweils vier T-Zell-Isolierungen gemittelt. Bei den an Tag drei und Tag vier nach der Aktivierung transfizierten Zellen war der Anteil der eGFP-positiven Zellen, 24 h nach der Transfektion, mit  $59,6 \pm 13,7 \%$  bzw.  $67,9 \pm 15,9 \%$  höher als der der an Tag zwei nach der Aktivierung transfizierten Zellen (Abbildung 10 b). Der geometrische Mittelwert des eGFP-Signals war bei den an Tag zwei, Tag drei und Tag vier transfizierten T-Zellen am höchsten, aber von Tag vier auf Tag fünf ließ sich eine signifikante Abnahme feststellen (Abbildung 10 c). Mittels PI-Färbung konnte

gezeigt werden, dass der Tag der Elektroporation keinen Einfluss auf die Vitalität der transfizierten T-Zellen hatte (Daten nicht gezeigt). Als optimale Zeitpunkte für die mRNA-Transfektion von T-Zellen im Hinblick auf die Ausbeute an rekombinant exprimiertem Protein wurden somit die Tage drei und vier nach der T-Zell-Aktivierung bestimmt.

#### **4.1.2.4 Expression und Lokalisation von eGFP in T-Zellen in Abhängigkeit vom ER-Signalpeptid**

Der Einfluss des ER-Signalpeptids von IFN $\gamma$  auf die Expression von eGFP in T-Zellen sollte untersucht werden, indem eGFP mit und ohne ER-Signalpeptid in T-Zellen exprimiert wurde. Dabei sollten die Auswirkungen des Signalpeptids auf die eGFP-Lokalisation in den T-Zellen, die Signalstärke des eGFP und die Vitalität der Zellen untersucht werden. Dafür wurde der Expressionsvektor pGEM-4Z/EGFP/A64 kloniert und als Templat für die *in vitro*-Synthese der eGFP-kodierenden mRNA verwendet (Abbildung 6 a). Für die Analyse der Expression von eGFP, dessen Translokation in das ER durch SP(i) initiiert wurde, wurden T-Zellen an Tag drei nach der Aktivierung mit 25  $\mu$ g SP(i)-eGFP-mRNA und zum Vergleich mit 25  $\mu$ g eGFP-mRNA transfiziert. Die eGFP-Lokalisation wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Der Anteil der positiv transfizierten T-Zellen sowie die Intensität des eGFP-Signals wurden für beide T-Zell-Populationen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Parallel dazu wurde eine PI-Färbung durchgeführt, um den Einfluss der Transfektion auf die Vitalität der Zellen zu untersuchen.



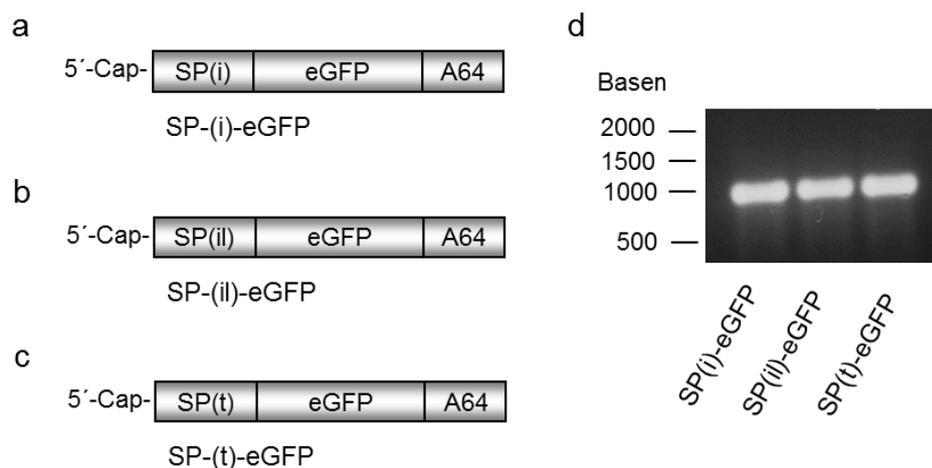
**Abbildung 11: Einfluss des ER-Signalpeptids von IFN $\gamma$  auf die Lokalisation von eGFP in T-Zellen.**  $5 \times 10^6$  T-Zellen wurden mit  $10 \mu\text{g}$  eGFP-mRNA und  $10 \mu\text{g}$  SP(i)-eGFP-mRNA transfiziert. (a) Die eGFP-Lokalisation in mit eGFP-mRNA transfizierten T-Zellen wurde 3 h nach der Transfektion (a), die von eGFP in mit SP(i)-eGFP-mRNA transfizierten T-Zellen wurde 3,5 h nach der Transfektion (b) im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Objektiv: 60 x, Maßstab:  $50 \mu\text{m}$ . (c) Anteil eGFP-positiver T-Zellen, transfiziert mit eGFP-mRNA und SP(i)-eGFP-mRNA; 6 h nach der Transfektion im FACS analysiert. Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  s.d. von drei unabhängigen Versuchen, durchgeführt in Duplikaten. Sternchen repräsentieren die statistische Signifikanz ( $p \leq 0,05$ : \*).

Die Mikroskopie-Aufnahmen zeigten eine unterschiedliche eGFP-Lokalisation in mit SP(i)-eGFP-mRNA und eGFP-mRNA transfizierten T-Zellen wenige Stunden nach der Transfektion (Abbildung 11 a, b). In T-Zellen, die mit eGFP-mRNA transfiziert wurden, war das Fluoreszenzsignal von eGFP 3 h nach der Transfektion über die gesamte T-Zelle verteilt, es waren keine subzellulären Strukturen zu erkennen (Abbildung 11 a). In mit SP(i)-eGFP-mRNA transfizierten T-Zellen lag das eGFP 3,5 h nach der Transfektion in ER-förmigen Strukturen vor (Abbildung 11 b). Hieraus kann geschlossen werden, dass das Voranstellen des ER-Signalpeptids von IFN $\gamma$  die Translokation von eGFP in das ER erfolgreich initiiert hat. Vergleicht man die Verteilung des eGFP in mit eGFP-mRNA transfizierten T-Zellen (Abbildung 11 a) in mit SP(i)-eGFP-mRNA transfizierten T-Zellen 6 und 24 h nach der Transfektion (Abbildung 9 c, d), so ist kein Unterschied zu erkennen. Dies bestätigt die Vermutung, dass eGFP trotz ER-Signalpeptid 24 h nach der Transfektion zumindest teilweise im Zytosol der T-Zellen vorlag. Die Analyse der eGFP-positiven Zellen mittels Durchflusszytometrie zeigte eine Erhöhung des Anteils der mit eGFP-mRNA transfizierten T-Zellen um  $70 \pm 54 \%$  gegenüber den mit SP(i)-eGFP-mRNA transfizierten T-Zellen (Abbildung 11 c). Der geometrische Mittelwert der mit eGFP-mRNA transfizierten T-Zellen stieg im Vergleich zu dem der mit SP(i)-eGFP-mRNA transfizierten T-Zellen

ebenfalls an (Daten nicht gezeigt). Mittels PI-Färbung konnte gezeigt werden, dass das Anfügen eines ER-Signalpeptids an das eGFP keinen Einfluss auf die Vitalität der eGFP-exprimierenden T-Zellen hatte (Daten nicht gezeigt).

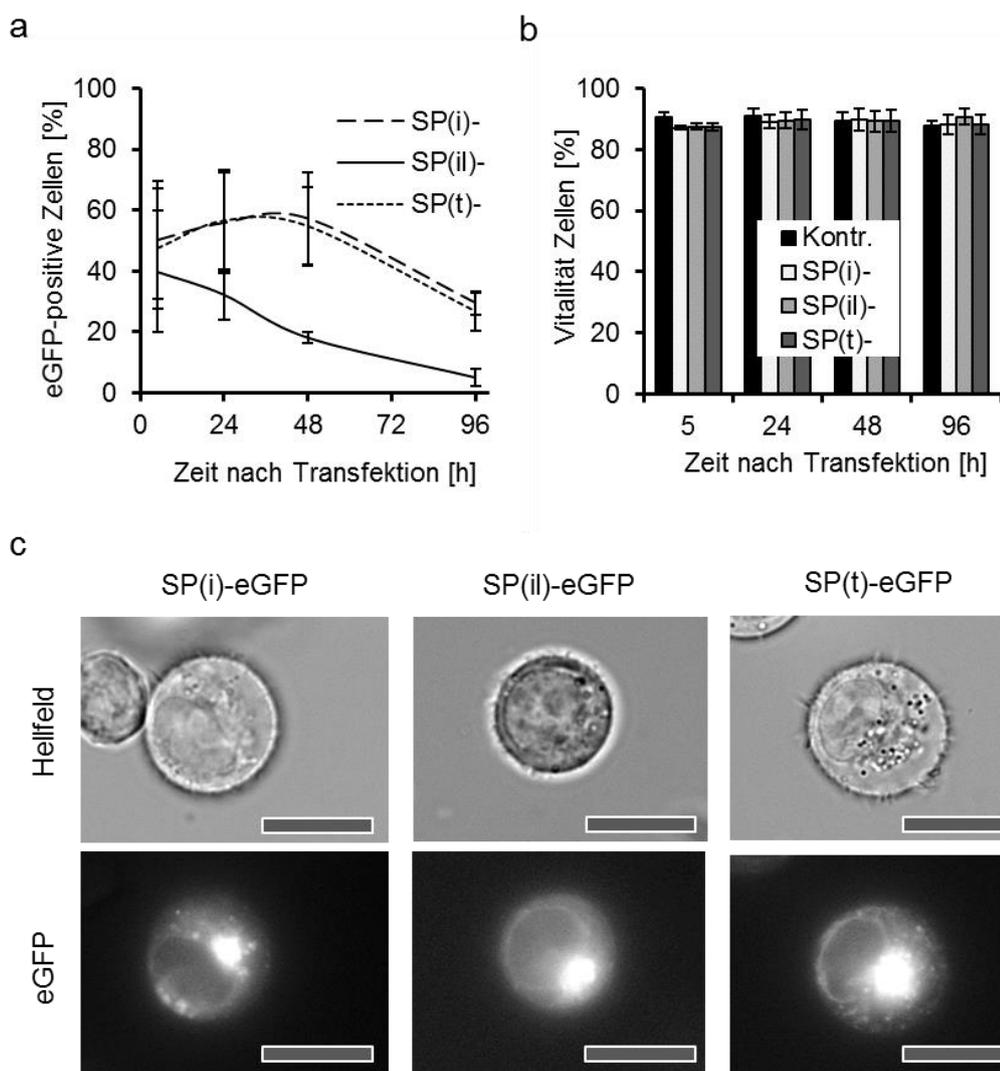
#### 4.1.2.5 Vergleich der eGFP-Expression in T-Zellen mit verschiedenen ER-Signalpeptiden

Da die eGFP-Translokation in das ER eine wichtige Voraussetzung für die erfolgreiche Sekretion des rekombinanten Proteins ist, sollte der Einfluss verschiedener ER-Signalpeptide auf die Translokation von eGFP in das ER untersucht werden. Für die ER-Signalpeptide von humanem IFN $\gamma$ , humanem IL-2 und dem humanen TGF- $\beta$ -2 wurde beschrieben, dass sie die Translokation des jeweiligen Proteins in das ER initiieren (Signal peptide database). Die ER-Translokation wird durch den Sec61-Komplex gesteuert, wobei das ER-Signalpeptid durch den Signalerkennungspartikel gebunden wird, der dann an den Sec61-Komplex bindet, woraufhin das Protein durch den Sec61-Komplex in das Lumen des ER transportiert wird. Bei Sekretionsproteinen, von denen die hier verwendeten ER-Signalpeptide stammen, werden diese durch die Signalpeptidase abgespalten und das Protein dadurch in das Lumen des ER frei gegeben (Lang *et al.*, 2017). Die Gensequenzen, die für die drei verschiedenen Signalpeptide kodieren, wurden wie in 2.2.1 beschrieben der eGFP-Sequenz vorangestellt. Die resultierenden Expressionsvektoren pGEM-4Z-SP(i)-EGFP-A64, pGEM-4Z-SP(ii)-EGFP-A64 und pGEM-4Z-SP(t)-EGFP-A64 wurden als Template für die *in vitro*-Synthese der mRNA verwendet (Abbildung 12).



**Abbildung 12: Schematische Darstellung von SP(i)-eGFP-mRNA, SP(ii)-eGFP-mRNA und SP(t)-eGFP-mRNA. (a - c)** *In vitro* translatierte mRNA, die für eGFP kodiert, dem das Signalpeptid von IFN $\gamma$  (a), von IL-2 (b) oder TGF- $\beta$ -2 (c) N-terminal angefügt wurde. (d) Analyse von eGFP kodierenden mRNA-Varianten im 1,2 %igen denaturierenden Agarosegel.

Um die eGFP-Translokation in das ER durch die drei ER-Signalpeptide zu untersuchen, wurden T-Zellen an Tag vier nach der Aktivierung mit jeweils 10 µg der SP(i)-mRNA, SP(ii)-mRNA und SP(t)-mRNA transfiziert. Außerdem sollten der Einfluss der ER-Signalpeptide auf die Intensität und Lokalisation des eGFP-Signals in den eGFP-exprimierenden T-Zellen auf und eine mögliche Beeinträchtigung der Zellvitalität hin untersucht werden.



**Abbildung 13: Expression und Lokalisation von eGFP in Abhängigkeit vom ER-Signalpeptid.**  $5 \times 10^6$  T-Zellen wurden mit jeweils 10 µg SP(i)-eGFP-mRNA, SP(ii)-eGFP-mRNA und SP(t)-eGFP-mRNA transfiziert. Der Anteil der eGFP-positiven T-Zellen **(a)** und die T-Zellvitalität **(b)** wurden 5 h, 24 h, 48 h und 96 h nach der Transfektion im FACS analysiert. **(a, b)** Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  s.d. von drei unabhängigen Versuchen, durchgeführt in Duplikaten. **(c)** eGFP-Lokalisation in T-Zellen 1,5 bis 2,5 h nach der Transfektion im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Objektiv: 60 x, Maßstab: 10 µm.

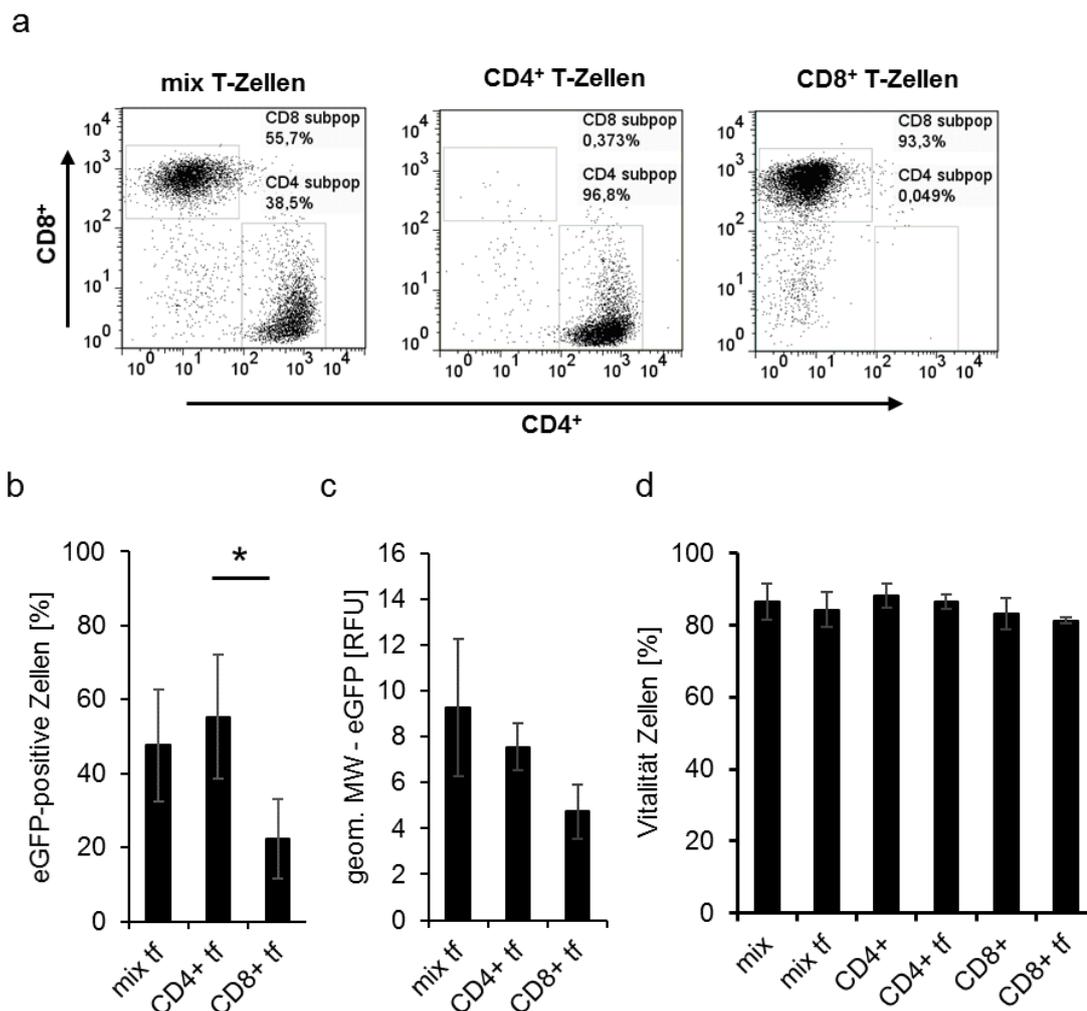
Die Analyse des Anteils der eGFP-positiven T-Zellen zeigte für die Verwendung der ER-Signalpeptide von IFN $\gamma$  und TGF- $\beta$ -2 höhere Werte als bei Verwendung des ER-Signalpeptids von IL-2 (Abbildung 13 a). Entsprechend des niedrigeren Ausgangswerts nahm die eGFP-Intensität in den mit SP(ii)-eGFP-mRNA transfizierten T-Zellen schneller

ab als die eGFP-Intensität der mit SP(i)-eGFP-mRNA oder SP(t)-eGFP-mRNA transfizierten T-Zellen. Der geometrische Mittelwert der eGFP-positiven T-Zellen war entsprechend bei den mit SP(il)-eGFP-mRNA transfizierten T-Zellen niedriger als bei den mit eGFP-mRNA oder SP(t)-eGFP-mRNA transfizierten Zellen (Daten nicht gezeigt). Die Untersuchung der Vitalität der T-Zellen mittels PI-Färbung zeigte, dass eine Variation des ER-Signalpeptids keinen signifikanten Einfluss auf die Vitalität der transfizierten Zellen hatte (Abbildung 13 b). Mittels Fluoreszenzmikroskopie konnte gezeigt werden, dass eGFP, dem eines der drei ER-Signalpeptide von IFN $\gamma$ , IL-2 oder TGF- $\beta$ -2 N-terminal angefügt worden war, circa 2 h nach der Transfektion in den T-Zellen in ER-förmigen Strukturen vorlag (Abbildung 13 c). Es konnte deshalb davon ausgegangen werden, dass die Translokation von eGFP in das ER durch alle drei ER-Signalpeptide initiiert wurde. 24 h nach der Transfektion konnten bei keiner der drei eGFP-Varianten eine ER- oder Golgi-förmige Struktur erkannt werden, da das eGFP-Signal jeweils in der gesamten Zelle zu detektieren war (Daten nicht gezeigt). Aufgrund des hohen eGFP-Signals von T-Zellen, die mit SP(i)-eGFP-mRNA transfiziert waren, wurde für die folgenden Versuche das eGFP, dem das Signalpeptid des IFN $\gamma$  vorangestellt war, verwendet.

#### **4.1.2.6 Vergleich der eGFP-Expression in CD4<sup>+</sup> -T-Zellen und in CD8<sup>+</sup> -T-Zellen**

T-Zellen lassen sich in CD4-positive T-Helferzellen und CD8-positive, zytotoxische T-Zellen unterteilen. Die CD8<sup>+</sup> -T-Zellen sind in einer adoptiven T-Zell-Therapie von größerer Bedeutung als die CD4<sup>+</sup> -T-Zellen, weil sie eine höhere zytotoxische Kapazität haben. In einer Therapie könnte es eventuell von Vorteil sein, nur eine T-Zellpopulation einzusetzen oder die CD4<sup>+</sup> -T-Zellen und die CD8<sup>+</sup> -T-Zellen getrennt zu behandeln. Deshalb sollte untersucht werden, ob sich die Effizienz der Transfektion und die eGFP-Expression eGFP bei den genannten T-Zell-Subpopulationen voneinander unterscheidet.

Die zu untersuchenden CD4<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>- und gemischte T-Zell-Subpopulation wurde jeweils mit dem entsprechenden RosetteSep Human T Cell Enrichment Cocktail negativ aufgereinigt. Nach einer Aktivierung mit MACSiBeads für drei Tage wurde die Effizienz der Aufreinigung aller drei T-Zellsubpopulationen untersucht, indem eine Antikörperfärbung gegen die Oberflächenmarker CD4 mit einem FITC-markierten anti-human CD4-Antikörper und für die Detektion des CD8 mit einem Alexa647-markierte anti-human CD8-Antikörper durchgeführt und mittels Durchflusszytometrie analysiert wurde. Für den Vergleich der eGFP-Expression in transient transfizierten CD4<sup>+</sup> -T-Zellen und CD8<sup>+</sup> -T-Zellen wurden die T-Zell-Subpopulationen an Tag vier nach der Aktivierung mit jeweils 25  $\mu$ g SP(il)-eGFP-mRNA transfiziert und die eGFP-Expression und die Zellvitalität mittels PI-Färbung und Durchflusszytometrie untersucht (Abbildung 14).



**Abbildung 14: Expression von eGFP in CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen nach Transfektion mit SP(ii)-eGFP-mRNA. (a)** Exemplarische Antikörperfärbungen gegen CD4 und CD8 in einer gemischten T-Zell-Population (mix-T-Zellen), einer CD4<sup>+</sup> und einer CD8<sup>+</sup>-T-Zellsubpopulation jeweils an Tag drei nach der Aktivierung im FACS analysiert. **(b, c, d)** 5 x 10<sup>6</sup> T-Zellen der verschiedenen T-Zell-Subpopulationen wurden jeweils mit 25 µg SP(ii)-eGFP-mRNA transfiziert und die eGFP-Expression 24 h nach der Transfektion im FACS analysiert. **(b)** Anteil der eGFP-positiven T-Zellen an der Gesamtlebendzellzahl. **(c)** Geometrischer Mittelwert der eGFP-positiven T-Zellen. **(d)** Zellvitalität nach PI-Färbung. **(b, c, d)** Daten sind dargestellt als Mittelwerte ± s.d. von drei unabhängigen Versuchen, durchgeführt in Duplikaten. Sternchen repräsentieren die statistische Signifikanz ( $p \leq 0,05$ : \*).

Die Antikörperfärbung der T-Zell-Marker CD4 und CD8 der gemischten T-Zell-Population an Tag drei nach der Aktivierung ergab einen Anteil von  $35,7 \pm 4\%$  CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und  $58,7 \pm 4,6\%$  CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (Abbildung 14 a). Das Verhältnis von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zu CD8<sup>+</sup>-T-Zellen beträgt in humanem, peripherem Blut normalerweise 2 : 1 bis 1 : 1 (Laborlexikon, 2018). Der im Vergleich mit dem Wert aus der Literatur hohe Anteil an CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in der gemischten T-Zell-Population kann auf die Aktivierung und IL-2-abhängige Proliferation der T-Zellen zurückzuführen gewesen sein. Es konnte gezeigt werden, dass die IL-2-abhängige Proliferationsrate von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen höher ist als die von

CD4<sup>+</sup> -T-Zellen. Für die CD4<sup>+</sup> -T-Zellsubpopulation konnte drei Tage nach der Aktivierung eine Reinheit von  $96,4 \pm 0,3$  % und für die CD8-T-Zellsubpopulation eine Reinheit von  $93,9 \pm 0,2$  % nachgewiesen werden (Abbildung 14 a). Die geringe Verunreinigung der CD4<sup>+</sup> -T-Zellpopulation mit CD8<sup>+</sup> -T-Zellen und die ebenfalls geringe Verunreinigung der CD8<sup>+</sup> -T-Zellpopulation mit CD4<sup>+</sup> -T-Zellen wurden vernachlässigt. Die eGFP-Expression war in den CD4<sup>+</sup> -T-Zellen gegenüber der gemischten T-Zell-Population auf  $117,8 \pm 14$  % erhöht, während die Expression in CD8<sup>+</sup> -T-Zellen auf  $53,2 \pm 29$  % erniedrigt war (Abbildung 14 b). Diese Daten zeigten, dass beide T-Zell-Subpopulationen nach der mRNA-Transfektion eGFP exprimieren, wobei der Anteil eGFP-positiver CD4<sup>+</sup> -T-Zellen gegenüber dem Anteil eGFP-positiver CD8<sup>+</sup> -T-Zellen signifikant erhöht war. Der geometrische Mittelwert war im Vergleich zu dem der gemischten T-Zell-Population bei den CD4<sup>+</sup> -T-Zellen ebenso erniedrigt, wie bei den CD8<sup>+</sup> -T-Zellen (Abbildung 14 c). Der zeitliche Verlauf des eGFP-Signals in CD4<sup>+</sup> -T-Zellen und CD8<sup>+</sup> -T-Zellen (Daten nicht gezeigt) entsprach dem der gemischten T-Zellpopulation wie in Abbildung 8 dargestellt. Die Vitalität der transfizierten T-Zell-Populationen wurde durch die Transfektion nicht signifikant beeinträchtigt und blieb während der untersuchten 96 h stabil (Abbildung 14 d). Es konnte gezeigt werden, dass mRNA-transfizierte CD4<sup>+</sup> -T-Zellen mehr rekombinantes Protein exprimieren als mRNA-transfizierte CD8<sup>+</sup> -T-Zellen. Für die hier angestrebte Kombinationstherapie war es folglich sinnvoll, eine gemischte T-Zellpopulation einzusetzen, da die CD4<sup>+</sup> -T-Zellen vermehrt das Immuntoxin sekretieren, wohingegen die CD8<sup>+</sup> -T-Zellen verstärkt den T-Zell-Effekt ausüben.

### **4.1.3 Transiente Transfektion von HEK293-Zellen mit eGFP-mRNA**

#### **4.1.3.1 Elektroporationsparameter für die mRNA-Transfektion von HEK293-Zellen**

Die Expression von rekombinantem Protein durch T-Zellen ist limitiert. Deshalb sollten Zelllinien, die für eine höhere Proteinexpression bekannt sind, für eine erhöhte mRNA-vermittelte eGFP-, oder Immuntoxin-Expression verwendet werden. Eine Differenzierung zwischen dem zytotoxischen Effekt des durch die T-Zellen exprimierten und sekretierten Immuntoxins und der intrinsische zytotoxische Eigenschaft der T-Zellen war in dieser Arbeit nicht möglich (4.2.5), weshalb die Verwendung der Zelllinie HEK293 für die Expression von Immuntoxinen einen zusätzlichen Vorteil bietet. Der zytotoxische Effekt des Immuntoxins kann hierbei unabhängig vom zytotoxischen Effekt der T-Zellen untersucht werden.

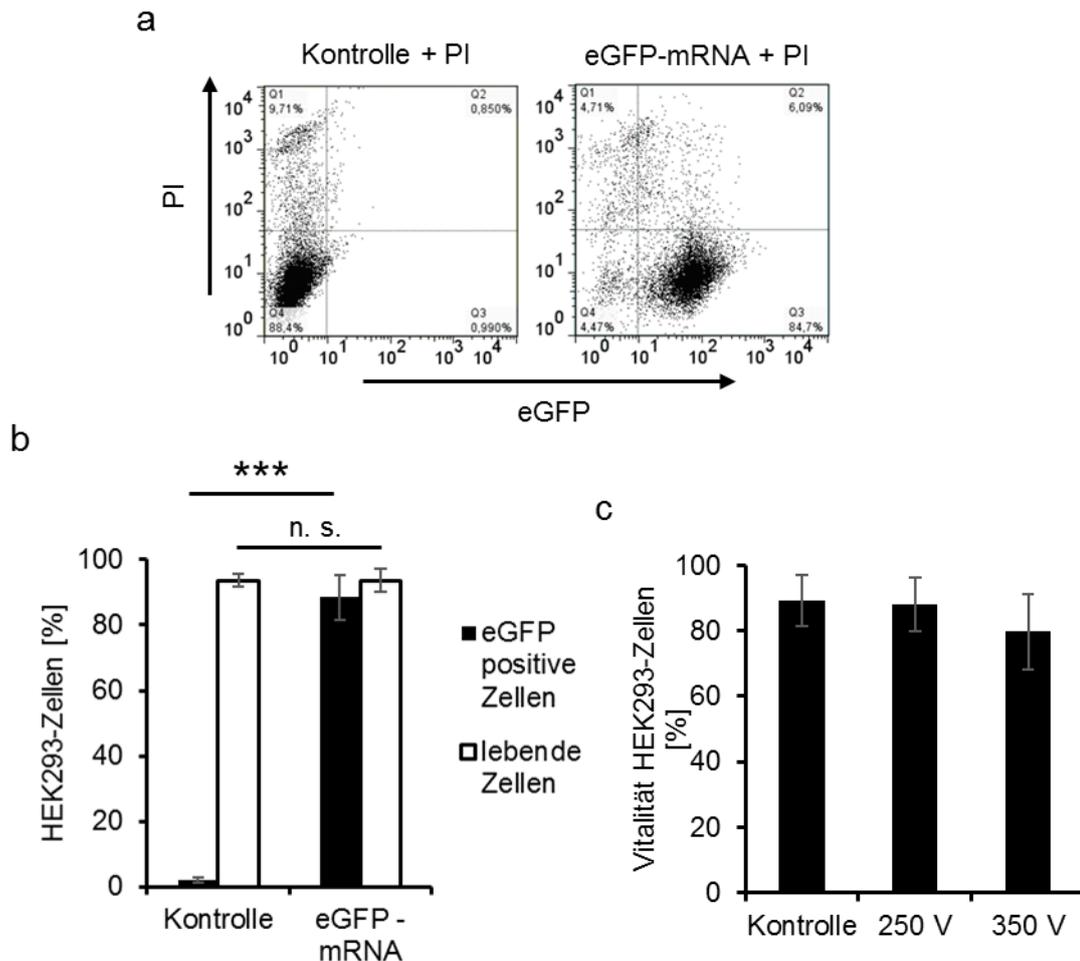
In ersten Versuchen wurden Zellen der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK293, der humanen monozytären Zelllinie THP1 und der humanen ovariellen Krebszelllinie SK-OV-3 in Lösung mit dem BTX 830 Elektroporator elektroporiert. Da die Transfektion mit einem Square-Wave-Elektroporator dieser Zelllinien in Lösung nicht beschrieben war, wurde ein Protokoll für die Transfektion mit mRNA mittels Elektroporation ausgearbeitet. Unter Berücksichtigung des Durchmessers der Krebszellen von circa 20  $\mu\text{m}$  wurde entsprechend der Formel 2 die Elektroporationen mit einem Elektrodenabstand von 4 mm und einer Pulsdauer von 800 ms bei unterschiedlich hohen elektrischen Spannungen durchgeführt. Die Analyse der Vitalität der elektroporierten Zelllinien THP1 und SK-OV-3 mittels PI-Färbung im Durchflusszytometer ergab für diese beiden Zelllinien eine stark reduzierte Vitalität (Daten nicht gezeigt).

**Tabelle 21: Parameter für die mRNA-Transfektion von HEK293-Zellen\***

Parameter	Wert
Elektrodenabstand (d)	4 mm
Elektrische Spannung ( $U$ )	350 V
Impulsdauer	800 ms

\* Bei der Elektroporation war zu beachten, dass die realen Werte von den beim BTX 830 Elektroporator eingegebenen Werten abwichen. Wurden die in Tabelle 21 dargestellten Einstellungen gewählt, betrug der reale Wert für die elektrische Spannung 348 V bei einer Impulsdauer von 803 ms.

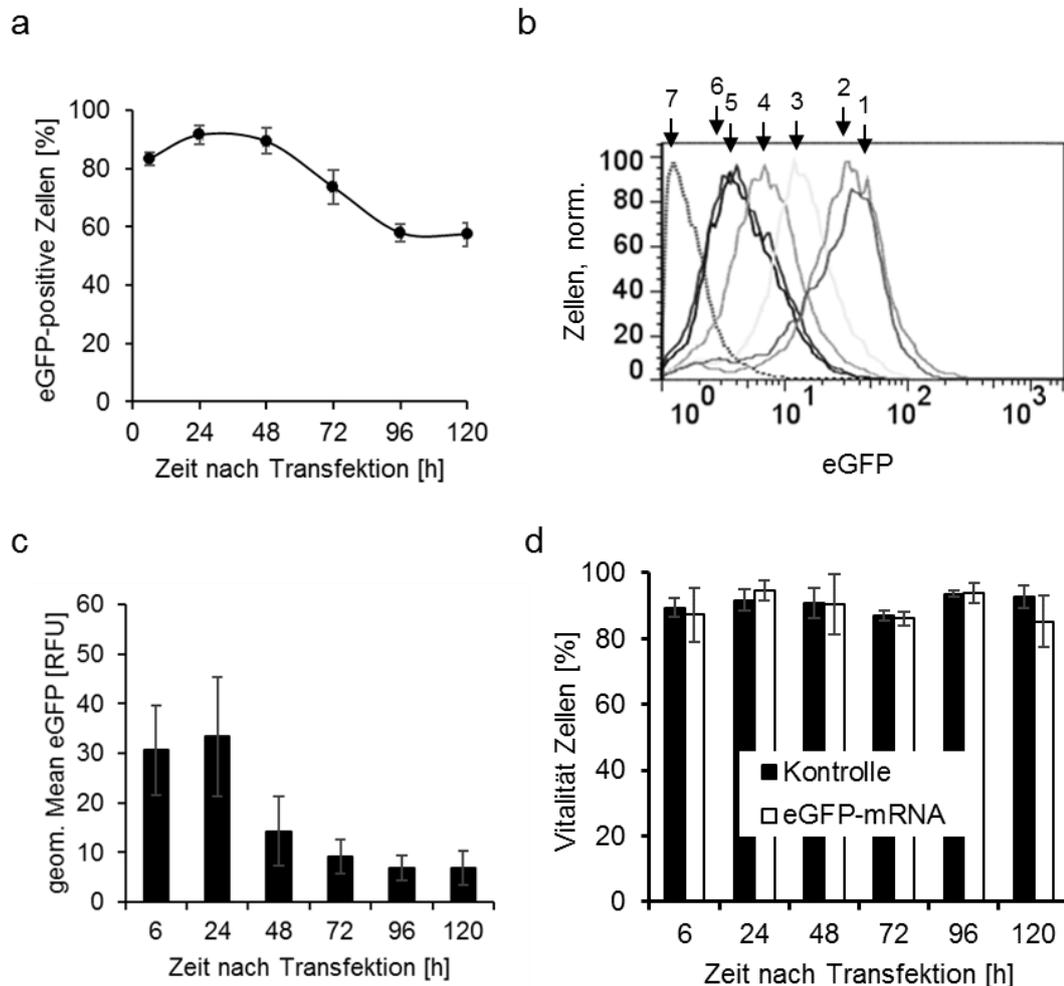
Mittels PI-Färbung konnte gezeigt werden, dass die Elektroporation der HEK293-Zellen weder bei 250 V noch bei 350 V zu einer signifikant verminderten Vitalität gegenüber nicht elektroporierten Zellen führte (Abbildung 15 c). Weil für eine elektrische Spannung von 350 V eine höhere Transfektionseffizienz zu erwarten war, wurde diese für die folgenden Versuche gewählt. Im Folgenden wurden HEK293-Zellen mit den in Tabelle 21 angegebenen Parametern mit 25  $\mu\text{g}$  SP(i)-eGFP-mRNA transfiziert und die Intensität des von den HEK293-Zellen rekombinant exprimierten eGFP und die Vitalität der transfizierten Zellen nach einer PI-Färbung mittels Durchflusszytometrie analysiert.



**Abbildung 15: Effizienz der Transfektion von HEK293-Zellen mit SP(i)-eGFP-mRNA.**  $5 \times 10^6$  HEK293-Zellen wurden mit  $25 \mu\text{g}$  SP(i)-eGFP-mRNA transfiziert und der Anteil an eGFP-exprimierenden HEK293-Zellen 24 h nach der Transfektion bestimmt. **(a)** FACS-Analyse von nicht transfizierten HEK293-Zellen und von mit SP(i)-eGFP-mRNA transfizierten HEK293-Zellen nach PI-Färbung. **(b)** Anteil der eGFP-positiven HEK293-Zellen und deren Vitalität. Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  s.d. von drei unabhängigen Versuchen, durchgeführt in Duplikaten. Sternchen repräsentieren die statistische Signifikanz ( $p \leq 0,005$ : \*\*\*). **(c)**  $5 \times 10^6$  HEK293-Zellen wurden bei 250 V und 350 V oder nicht (Kontrolle) elektroporiert und ihre Vitalität nach 24 h im FACS analysiert. Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  s.d. von zwei unabhängigen Versuchen, durchgeführt in Duplikaten. [Abbildung modifiziert nach Eggers *et al.*, 2018]

Abbildung 15 a zeigt, dass der geometrische Mittelwert der eGFP-positiven HEK293-Zellen mit circa 80 RFU höher lag als der der eGFP-positiven T-Zellen (Abbildung 8 c), weshalb die Population der transfizierten HEK293-Zellen (Q3) von der Population der nicht transfizierten HEK293-Zellen (Q4) abzugrenzen war. Dies zeigt, dass die eGFP-Expression in den HEK293-Zellen höher war als in den T-Zellen. Mit den in Tabelle 21 angegebenen Parametern konnte für HEK293-Zellen, die transient mit  $25 \mu\text{g}$  SP(i)-eGFP-mRNA transfiziert wurden, 24 h nach der Transfektion ein Anteil von  $88,5 \pm 7,1$  % eGFP-positiver Zellen erreicht werden. Dabei war die Vitalität der transfizierten HEK293-Zellen gegenüber der Kontrolle nicht signifikant vermindert (Abbildung 15 b).

Um den zeitlichen Verlauf der eGFP-Expression in HEK293-Zellen zu untersuchen, wurden diese mit SP(i)-eGFP-mRNA transfiziert und der Anteil der positiv transfizierten Zellen und die Intensität des eGFP-Signals mittels Durchflusszytometrie über einen Zeitraum von 120 h analysiert. Die Vitalität der eGFP-exprimierenden HEK293-Zellen wurde mittels PI-Färbung und Durchflusszytometrie untersucht.



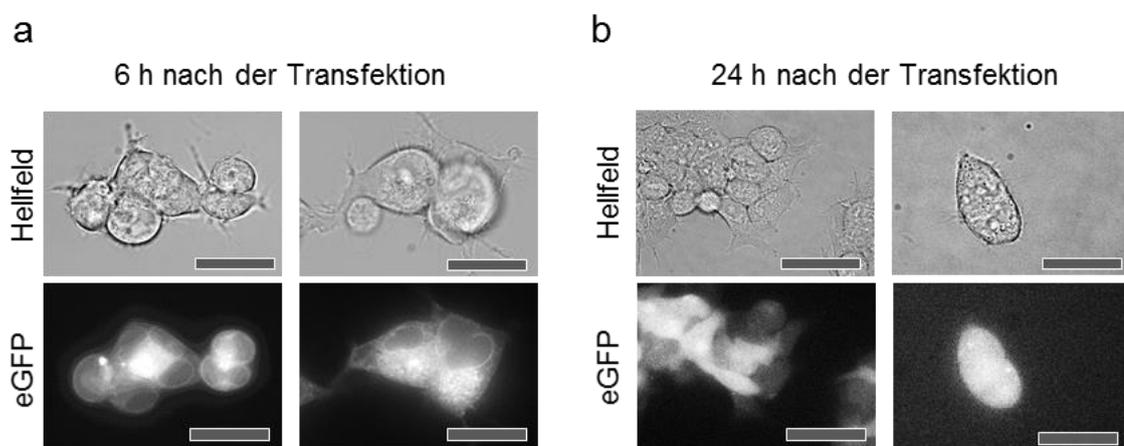
**Abbildung 16: Zeitlicher Verlauf der Expression von eGFP in HEK293-Zellen.**  $5 \times 10^6$  HEK293-Zellen wurden mit  $25 \mu\text{g}$  SP(i)-eGFP-mRNA transfiziert und die eGFP-Expression zu den angegebenen Zeitpunkten mittels Durchflusszytometrie analysiert. **(a)** Anteil der eGFP-positiven HEK293-Zellen an der Gesamtzellzahl. **(b)** eGFP-Signal von mit SP(i)-eGFP-mRNA transfizierten HEK293-Zellen 6 h (1), 24 h (2), 48 h (3), 72 h (4), 96 h (5) und 120 h (6) nach der Transfektion. Kontrolle nach 120 h (7). **(c)** Geometrischer Mittelwert der eGFP-positiven HEK293-Zellen. **(d)** Vitalität der HEK293-Zellen, PI-Färbung. **(a, c, d)** Nicht transfizierte Zellen wurden als Kontrolle verwendet. Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  s.d. von zwei unabhängigen Versuchen, durchgeführt in Duplikaten.

Die Intensität des eGFP-Signals der mit SP(i)-eGFP-mRNA transfizierten HEK293-Zellen war bis zu 48 h nach der Transfektion maximal, danach nahm sie stetig ab (Abbildung 16 a). Die eGFP-Expression war etwas höher, aber im Verlauf vergleichbar mit der mRNA-vermittelten eGFP-Expression in T-Zellen (Abbildung 8 a). Im Histogramm war eine maximale Intensität während der ersten 24 h zu erkennen, danach nahm diese ab

(Abbildung 16 b). Ebenfalls mit der eGFP-Expression in T-Zellen vergleichbar war die stetige Abnahme des eGFP-Signals in den HEK293-Zellen während der folgenden fünf Tage. Noch 120 h nach der Transfektion war die Zellpopulation deutlich eGFP-positiv. Der maximale geometrische Mittelwert des eGFP-Signals in den HEK293-Zellen war 24 h nach der Transfektion erreicht (Abbildung 16 c). Die PI-Färbung ergab keine signifikant erniedrigte Vitalität nach der Transfektion mit SP(i)-eGFP-mRNA. Die Vitalität der transfizierten HEK293-Zellen war weder kurzfristig, durch die Elektroporation noch langfristig durch die Expression von rekombinatem eGFP beeinträchtigt (Abbildung 16 d). Im Folgenden wurden deshalb HEK293-Zellen als alternative Expressionsplattform für T-Zellen eingesetzt.

#### 4.1.3.2 Lokalisation von eGFP in HEK293-Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie

Die Lokalisation von eGFP, dem das ER-Signalpeptid von IFN $\gamma$  vorangestellt war, sollte auch in HEK293-Zellen untersucht werden. Dafür wurden HEK293-Zellen mit SP(i)-eGFP-mRNA transfiziert und die eGFP-Lokalisation mittels Lebendzellmikroskopie im Fluoreszenzmikroskop analysiert.



**Abbildung 17: Lokalisation von eGFP in HEK293-Zellen transfiziert mit SP(i)-eGFP-mRNA.**  $5 \times 10^6$  HEK293-Zellen wurden mit  $10 \mu\text{g}$  SP(i)-eGFP-mRNA transfiziert und die eGFP-Lokalisation im Fluoreszenzmikroskop analysiert. **(a)** 6 h nach der Transfektion. Objektiv: 60 x, Maßstäbe:  $20 \mu\text{m}$ . **(b)** und 24 h nach der Transfektion. Objektiv: 60 x, Maßstäbe: links  $50 \mu\text{m}$ , rechts  $12,5 \mu\text{m}$ .

Die Fluoreszenzaufnahmen von HEK293-Zellen zeigten, dass das eGFP 6 h nach der Transfektion in Strukturen des ER und des Golgi-Apparates lokalisiert war (Abbildung 17 a). 24 h nach der Transfektion war das eGFP-Signal über die gesamte Zelle verteilt (Abbildung 17 b). Es kann also wie bei den T-Zellen davon ausgegangen werden, dass das eGFP, initiiert durch das Signalpeptid, in das ER transportiert wurde und dass 24 h nach der Transfektion ebenfalls zumindest ein Anteil des eGFP auch im Zytosol vorlag. Die

Ergebnisse der HEK293-Zellen ähneln denen der T-Zellen, was darauf hinweist, dass das eGFP in beiden Zelltypen ähnlich effizient prozessiert wurde.

Mittels Elektroporation von T-Zellen und HEK293-Zellen mit eGFP-kodierender mRNA konnte erfolgreich eine eGFP-Expression in circa 80 % respektive 90 % der Zellen, bei nicht beeinträchtigter Vitalität, erreicht werden (Abbildung 7, Abbildung 15). Dafür wurden die Protokolle für die Elektroporation von T-Zellen und HEK293-Zellen unter anderem in Bezug auf die Elektroporationsparameter und den Aktivierungsstatus der T-Zellen hin optimiert, so dass eine effiziente und schonende Transfektion mit Immuntoxin-kodierender mRNA möglich ist. Durch Anfügen der ER-Signalpeptide von IFN $\gamma$ , TGF- $\beta$ -2 und IL-2 konnte eine Translokation von eGFP in das ER gezeigt werden, weshalb für die gewünschte ER-Translokation des Immuntoxins e23-PE38 das ER-Signalpeptid von IFN $\gamma$  ausgewählt wurde. Mit den so erarbeiteten Parametern für die mRNA-Transfektion wurde im Folgenden die Expression von Immuntoxinen in T-Zellen und HEK293-Zellen initiiert.

## **4.2 Immuntoxin-Varianten für die Expression in T-Zellen und HEK293-Zellen**

### **4.2.1 Konstruktion der Immuntoxine e23-PE38 und VEGF-PE38**

#### **4.2.1.1 Aufbau der Immuntoxine**

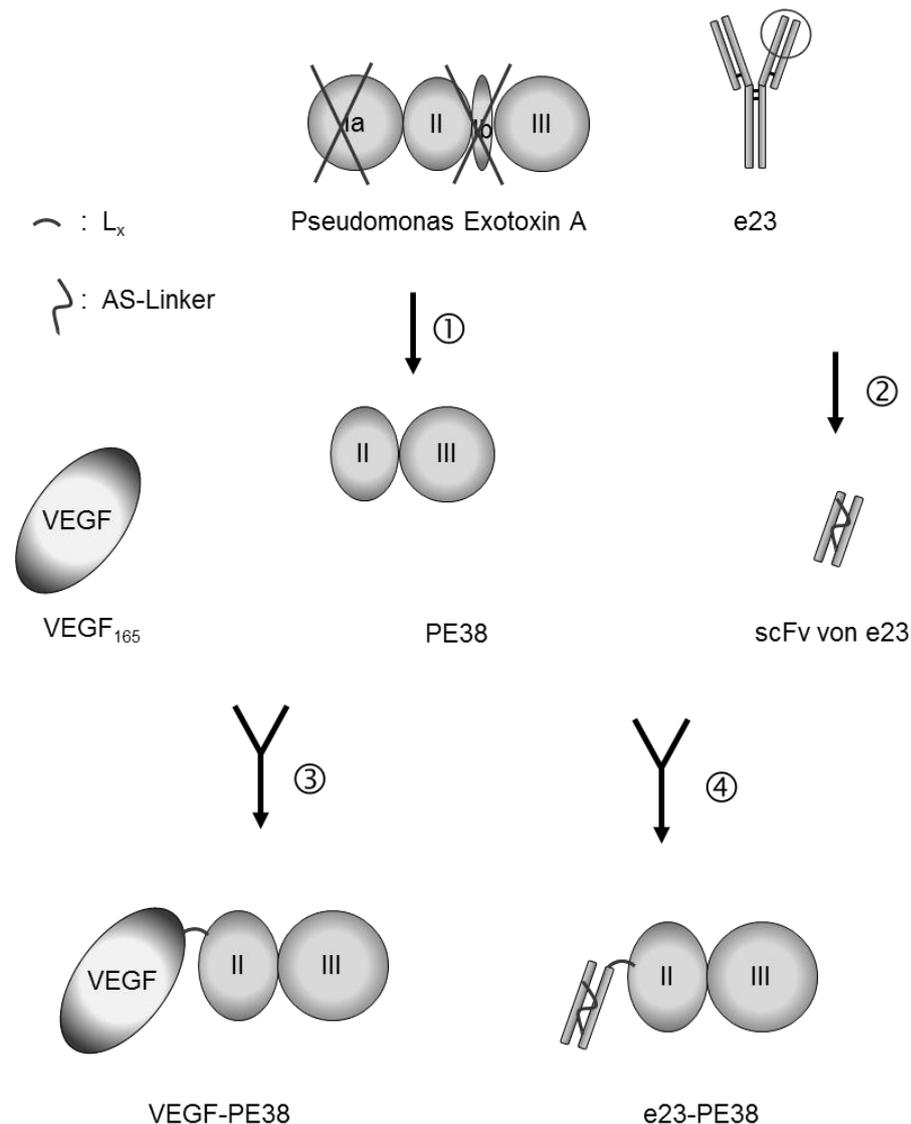
Für die Expression von Immuntoxinen durch mRNA-transfizierte T-Zellen wurden zwei proteinbasierte Immuntoxine konstruiert, die als durchgehende Polypeptide translatiert werden. Als Zielkomponenten wurden die zwei proteinbasierten Zielkomponenten scFv-e23 und VEGF<sub>165</sub> gewählt, die jeweils mit der ebenfalls proteinbasierten Toxinkomponente PE38 über einen flexiblen Aminosäurelinker (L<sub>x</sub>) miteinander verbunden wurden (Abbildung 18). Dieser Aminosäurelinker stellt eine stabile aber flexible Verbindung der beiden Komponenten des Immuntoxins dar und gewährt gleichzeitig einen Abstand der beiden Komponenten zueinander. Die Aminosäuren eines flexiblen Aminosäurelinkers sind in der Regel klein, nicht polar (z. B. Glycin) oder polar (z. B. Serin oder Threonin), was dem Linker Flexibilität gibt und Bewegungsfreiheit für die miteinander verbundenen Komponenten gewährleistet (Chen *et al.*, 2012). Für diese Arbeit wurde der acht Aminosäuren lange Linker L<sub>x</sub> mit der Aminosäure-Sequenz SGGPEGGS aus dem Patent US5889157A, Abbildung 1 b, übernommen; dieser Linker wurde erfolgreich eingesetzt, um PE40 mit der

lichten Kette eines scFv-Fragments zu koppeln (Pastan *et al.*, 1999). Der Aminosäurelinker  $L_x$  wurde jeweils bündig zwischen die Zielkomponente und die Toxinkomponente gesetzt.

Als Toxinkomponente wurde PE38 gewählt, das molekularbiologisch mit dem N-Terminus über den Linker  $L_x$  mit jeweils einer der Zielkomponenten verbunden wurde (Abbildung 18). PE38 ist ein 38 kDa großes Derivat des PEA, das eine Größe von 66,5 kDa hat. Durch Entfernen der Domänen Ia und Ib konnte die Größe des Toxins auf circa 38 kDa reduziert werden. Die toxische Aktivität des Derivates PE38 war dabei nicht reduziert (Siegall *et al.*, 1991). Die 594 Aminosäuren lange Aminosäuresequenz für die Toxinkomponente PE38 wurde aus dem Patent WO 2009/125394, Sequenz 85, übernommen (Reiter, 2009).

Als erste Zielkomponente wurde das scFv-Fragment des monoklonalen Antikörpers e23 gewählt. Von fünf getesteten scFv-e23-Konstrukten, die jeweils mit PE38 konjugiert waren, konnte dieses die höchste Toxizität gegenüber SK-OV-3 und anderen Krebszelllinien vermitteln (Batra *et al.*, 1992). Der monoklonale anti-Her2/neu Antikörper e23 hat eine Masse von circa 150 kDa; durch die Reduktion des Antikörpers auf das scFv-e23 konnte die Masse der Zielkomponente auf circa 25 kDa reduziert werden. Je geringer die Masse des Immuntoxins ist, desto leichter kann das Immuntoxin das Tumorgewebe durchdringen. Es wird davon ausgegangen, dass die Bindeaffinität des scFv-e23 gegenüber dem originalen monoklonalen Antikörper nicht stark beeinträchtigt ist. Für scFv-e23, chemisch konjugiert mit der Toxinkomponente PE40, konnte eine relative Aktivität von 36 % gegenüber dem originalen monoklonalen Antikörper gezeigt werden. Die Aminosäuresequenz des scFv-e23 wurde der Publikation von Batra *et al.* (1992) entnommen. Damit das Immuntoxin sekretiert werden kann, muss es in das ER gelangen. Um die Translokation von e23-PE38 in das ER zu initiieren, wurde der Sequenz des scFv-e23 die Sequenz des Signalpeptids von IFN $\gamma$  vorangestellt. Die kodierende DNA-Sequenz des Signalpeptids von IFN $\gamma$  mit der Gene ID 19505 wurde der Signal Peptide Database entnommen.

Als zweite Zielkomponente wurde das humane VEGF<sub>165</sub> gewählt, das ein Molekulargewicht von 19,2 kDa hat. Da humanes VEGF<sub>165</sub> ein Sekretionsprotein ist, wurde das intrinsische ER-Signalpeptid des VEGF<sub>165</sub>, SP(v), für die Klonierung in der Sequenz belassen, so dass das SP(v) die Translokation des chimären Immuntoxins in das ER der T-Zellen initiieren kann. Die Sequenz der mRNA für die Isoform VEGF<sub>165</sub> des humanen VEGF wurde der NCBI GenDatenbank: AB021221.1 entnommen.



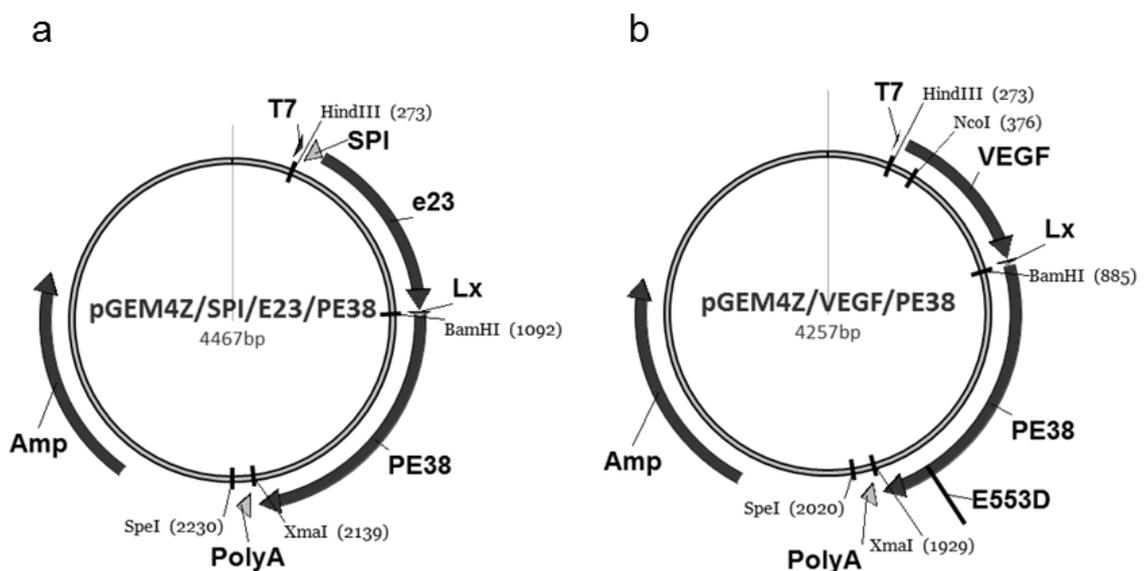
**Abbildung 18: Schematische Darstellung der Immuntoxine VEGF-PE38 und e23-PE38.** Die Domäne I von PEA (zusammengesetzt aus Domäne Ia und Ib) wurde molekularbiologisch entfernt ①. Der anti-Her2/neu Antikörper e23 wurde auf ein scFv-Fragment reduziert, die leichte und die schwere Kette wurden dabei molekularbiologisch über einen AS-Linker miteinander verbunden ②. VEGF<sub>165</sub> wurde rekombinant über den Aminosäurelinker L<sub>x</sub> mit PE38 verbunden. Das resultierende Protein wurde mit VEGF-PE38 bezeichnet ③. Das scFv-e23 wurde rekombinant über den Aminosäurelinker L<sub>x</sub> mit PE38 verbunden, das resultierende Protein wurde mit e23-PE38 bezeichnet ④.

#### 4.2.1.2 Klonierung der Immuntoxine VEGF-PE38 und e23-PE38

Die Immuntoxine wurden wie in 4.2.1.1 beschrieben konstruiert und wie in 2.2.1 beschrieben kloniert. Um ein Immuntoxin mit stark reduzierter Toxizität zu generieren, wurde eine Aminosäure im katalytischen Zentrum der Toxindomäne ausgetauscht. Bei Versuchen mit einer murinen Fibroblasten-Zelllinie konnten Douglas *et al.* (1987) zeigen, dass der Austausch der Asparaginsäure an Position 553 des nativen Proteins durch eine

Glutaminsäure die Toxizität des nativen PEA um einen Faktor von circa 10.000 reduzierte (Douglas *et al.*, 1987). Die entsprechende Punktmutation wurde durch eine gerichtete Mutagenese mit den Mutageneseprimern E553D\_F und E553D\_R (Tabelle 5) in den Vektor pGEM4Z/VEGF/PE38/A64 eingefügt, wobei sich die Nummerierung der Aminosäuren auf das native PEA bezieht. Der resultierende Expressionsvektor wurde mit pGEM4Z/VEGF/PE38D/ A64 benannt (Tabelle 3).

Mittels Agarosegelelektrophorese und Sequenzierung durch MWG-Operon wurden die Zwischenprodukte der Klonierungen und die Sequenzen der Endprodukte kontrolliert, die Sequenz-Analyse erfolgte mit der Software Vector NTI Advance®11.5. In Abbildung 19 sind die Vektorkarten der Expressionsvektoren, die für die Immuntoxine e23-PE38, dem das Signalpeptid SP(i) vorangestellt ist, und VEGF-PE38 kodieren, dargestellt.

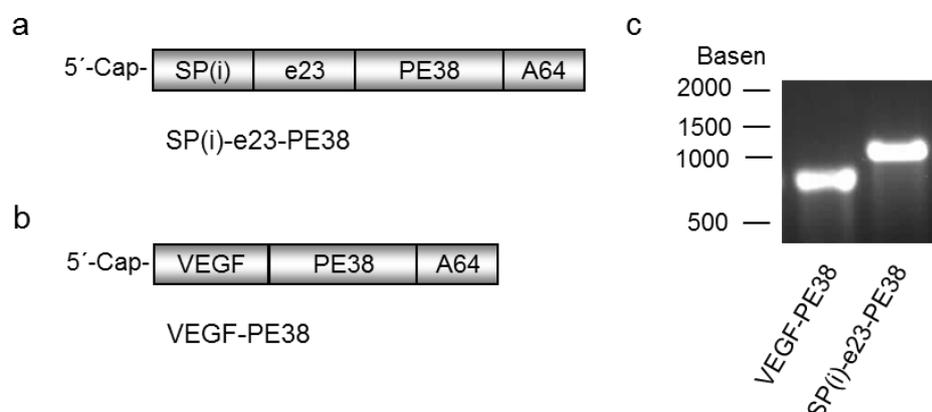


**Abbildung 19: Schematisch Darstellung zweier Vektoren für die *in vitro*-mRNA-Synthese von Immuntoxinen.** Die pGEM-4Z-Vektoren kodieren jeweils für einen T7-Promotor (T7), eine 64 Adenin-Nukleotide lange Poly(A)-Sequenz und eine Amp-Resistenz (Amp). **(a)** Vektor pGEM-4Z/SP(i)/E23/PE38 kodiert für e23-PE38, dessen Translokation in das ER durch ein Signalpeptid von IFN $\gamma$  initiiert wird. **(b)** Vektor pGEM-4Z/VEGF/PE38 kodiert für VEGF-PE38, dessen ER-Translokation ER durch das intrinsische ER-Signalpeptid von VEGF initiiert wird. **(a, b)** Eingezeichnet sind die Single Cut Restriktionsenzyme XmaI und SpeI für die Linearisierung der Vektoren und XbaI, NcoI und BamHI für die Klonierung.

## 4.2.2 Expression von Immuntoxinen in transient transfizierten T-Zellen

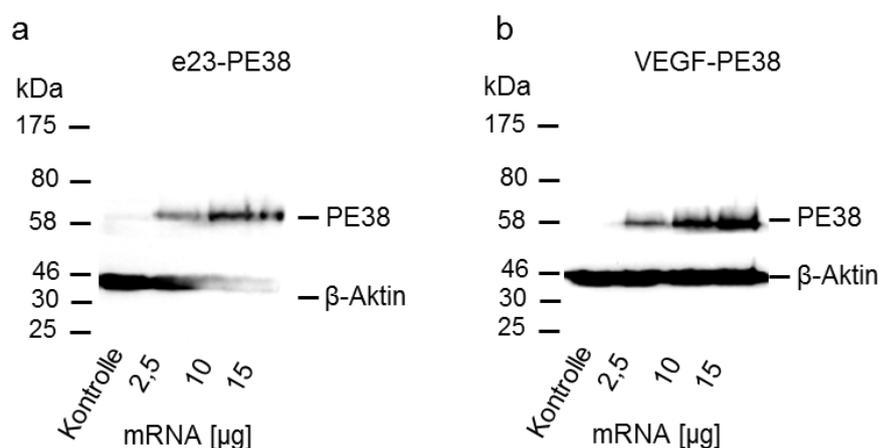
### 4.2.2.1 Abhängigkeit der Immuntoxin-Synthese von der Menge an transfizierter mRNA

Im Folgenden sollte die Expression der in 4.2.1 beschriebenen Immuntoxine, die mittels mRNA-Transfektion in T-Zellen initiiert wurde, untersucht werden. Ziel war die vollständige Expression der rekombinanten Immuntoxine durch aktivierte, primäre, humane T-Zellen. Bei der transienten Transfektion wird mRNA in die Zielzelle eingebracht, so dass die mRNA-kodierten Proteine über den Expressionsapparat der transfizierten Zelle synthetisiert werden können. Im Rahmen einer Therapie kann dabei die Tatsache genutzt werden, dass über die Dosierung der mRNA die Menge des durch die transfizierte Zelle synthetisierten Wirkstoffes variiert werden kann. Die Korrelation zwischen der Menge einer Antigen-kodierenden RNA und der Menge eines von transfizierten Zellen präsentierten Antigens konnte erstmals gezeigt werden indem mRNA-kodierte MHC-Komplexe auf der Zelloberfläche von T-Zellen quantifiziert wurden (Holtkamp, 2007). In der vorliegenden Arbeit konnte ein Zusammenhang zwischen der Menge der transfizierten SP(i)-eGFP-mRNA und der Zunahme des Fluoreszenzsignals des eGFP in den T-Zellen gezeigt werden, wodurch auf eine höhere Proteinkonzentration in der T-Zelle geschlossen werden konnte (Abbildung 7). Die Abhängigkeit der Menge des exprimierten Immuntoxins von der Menge der für die Transfektion eingesetzten mRNA sollte ebenfalls untersucht werden. Die Expressionsvektoren pGEM-4Z/SP(i)/E23/PE38/A64 und pGEM-4Z/VEGF/PE38/A64, die für die Immuntoxine e23-PE38 und VEGF-PE38 kodierten, dienten als Template für die *in vitro*-Synthese der SP(i)-e23-PE38-mRNA und SP(i)-e23-PE38-mRNA (Abbildung 20).



**Abbildung 20: Schematische Darstellung von SP(i)-e23-PE38-mRNA und VEGF-PE38-mRNA. (a)** *In vitro* translatierte mRNA, die für das Immuntoxin e23-PE38 kodiert. **(b)** *In vitro* translatierte mRNA, die für das Immuntoxin VEGF-PE38D kodiert. **(c)** Analyse von Immuntoxin-kodierender mRNA im 1,2 %igen denaturierenden Agarosegel.

Um den Zusammenhang zwischen der Menge der transfizierten Immuntoxin kodierenden mRNA und der Menge des durch die T-Zellen exprimierten Immuntoxins zu untersuchen, wurden T-Zellen mit unterschiedlicher Menge Immuntoxin kodierender mRNA transfiziert. Das durch die Transfektion von SP(i)-eGFP-mRNA etablierte Protokoll für die Transfektion von rekombinantem Protein, dessen Translokation durch ein Signalpeptid in das ER initiiert wurde, war auf maximale Proteinsynthese bei gleichzeitig nicht beeinträchtigt Vitalität der T-Zellen hin optimiert worden (Tabelle 19). Dieses Protokoll wurde ebenfalls verwendet, um die T-Zellen mit Immuntoxin kodierender mRNA zu transfizieren. Dafür wurden humane, periphere T-Zellen isoliert, aktiviert und an Tag vier nach der Aktivierung mit unterschiedlichen Mengen VEGF-PE38-mRNA und SP(i)-e23-PE38-mRNA transfiziert. Nach einer Inkubation von 8 h wurden die Zellen eines gesamten Transfektionsansatzes geerntet, mit PBS gewaschen und mit dem Cell Culture Lysis-Puffer lysiert. Mittels Bradford-Assay wurde der Proteingehalt der Zelllysate bestimmt, die Protein-Lösung mittels Gelelektrophorese und die Immuntoxine mittels Western-Analyse und einer spezifischen Immunfärbung detektiert. Für den Nachweis der PE38-basierten Immuntoxine wurde der polyklonale anti-PEA-Antikörper verwendet. Der anti-PEA-Antikörper, der gegen das native PEA gerichtet ist, wurde gewählt, weil mit ihm ein PE40, das mit einem scFv-Fragment konjugiert war, erfolgreich detektiert werden konnte (Pastan *et al.*, 1992). Die Detektion im Western Blot erfolgte mit dem ECL-Western Blotting Substrat und die Dokumentation des Chemilumineszenzsignal mit dem Chemidoc XRS.



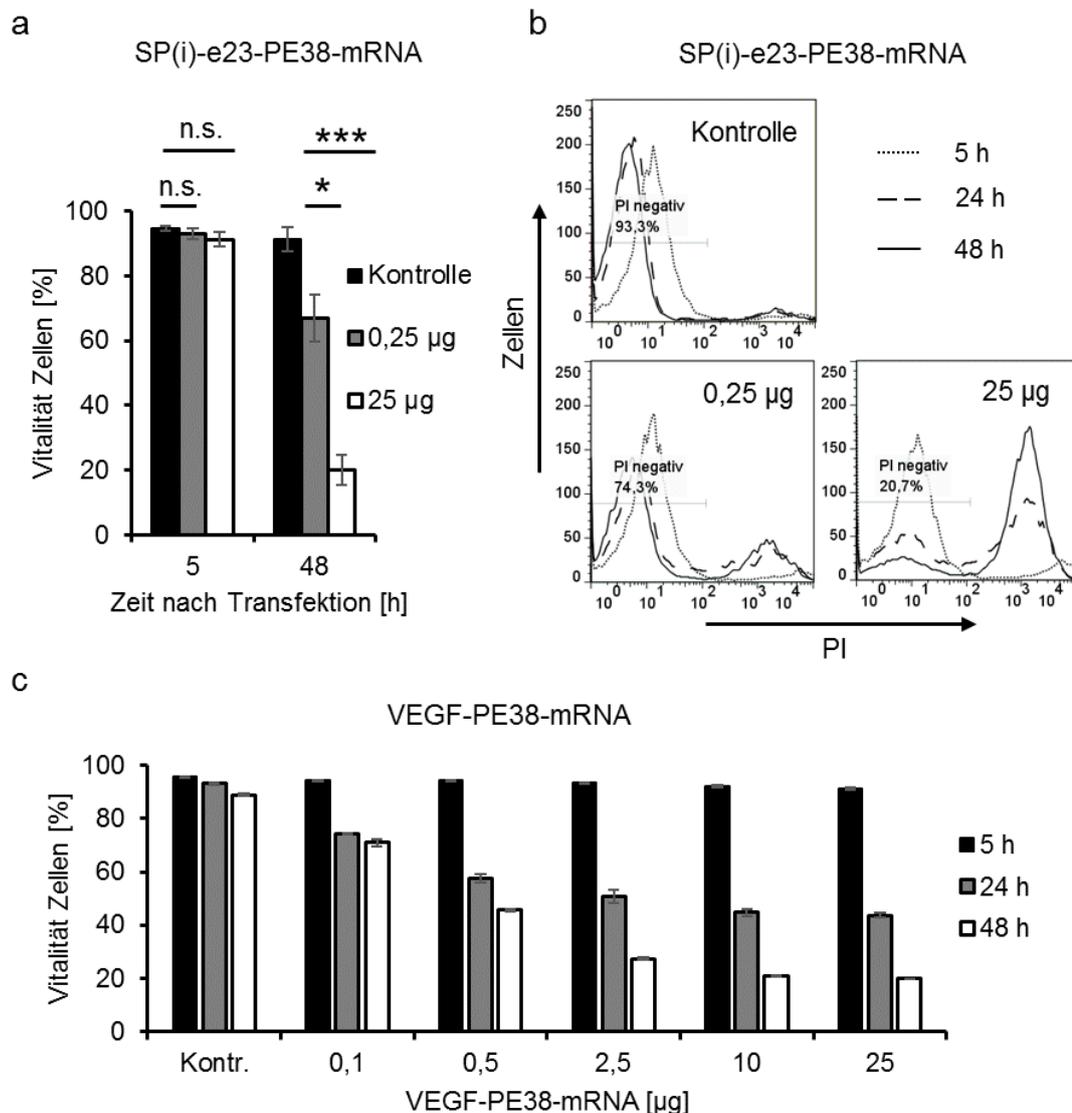
**Abbildung 21: Vorkommen der Immuntoxine im T-Zell-Lysat in Abhängigkeit von der Menge transfizierter mRNA.**  $5 \times 10^6$  T-Zellen wurden mit 2,5 µg, 10 µg und 15 µg Immuntoxin-kodierender mRNA transfiziert und nach 8 h lysiert. Als Kontrolle wurden nicht transfizierte T-Zellen verwendet. Jeweils 25 µg Protein wurden im 10 %igen SDS-Gel aufgetrennt. Die Immuntoxine e23-PE38 (a) und VEGF-PE38 (b) wurden mittels Immunfärbung im Western Blot gegen die PE38-Komponente nachgewiesen. Als Ladekontrolle wurde eine Färbung gegen β-Aktin durchgeführt. [Abbildung modifiziert nach Eggers *et al.*, 2018]

Die Expression der vollständigen Immuntoxine e23-PE38 und VEGF-PE38 durch die Transfektion von T-Zellen mit SP(i)-e23-PE38-mRNA respektive VEGF-PE38-mRNA konnte mittels Immunfärbungen nachgewiesen werden. Das Immuntoxin e23-PE38 wurde auf Höhe von circa 65 kDa detektiert (Abbildung 21 a), was in etwa dem für e23-PE38 theoretisch berechneten Molekulargewicht von 63,5 kDa entspricht. Auf Höhe von circa 58 kDa konnte das Immuntoxin VEGF-PE38 detektiert werden (Abbildung 21 b), was ebenfalls ungefähr dem für VEGF-PE38 theoretisch berechneten Molekulargewicht von 57,2 kDa entspricht. Das theoretische Molekulargewicht der Immuntoxine wurde mit der Software ExPasy des *SIB* Swiss Institute of Bioinformatics berechnet (Artimo *et al.*, 2012). Für die Berechnung wurde davon ausgegangen, dass die ER-Signalpeptide des VEGF und des IFN $\gamma$  abgespalten wurden. Sowohl für die Transfektion von SP(i)-e23-PE38-mRNA, als auch für die Transfektion von VEGF-PE38-mRNA galt, je mehr mRNA für die Transfektion eingesetzt wurde, desto mehr Immuntoxin wurde von den Zellen synthetisiert. Das Ergebnis konnte mittels Immunfärbung des  $\beta$ -Aktins auf Höhe von 42 kDa abgesichert werden. Die Analyse der Proteinmenge im Western Blot mit der Software ImageJ ergab für VEGF-PE38 einen absoluten Wert von 12771 bei einer Transfektion von 2,5  $\mu$ g mRNA, von 21717 bei einer Transfektion von 10  $\mu$ g mRNA und von 28192 bei einer Transfektion von 25  $\mu$ g mRNA (Abbildung 21 b) (Schneider *et al.*, 2012). Danach führt eine Erhöhung der mRNA-Menge um den Faktor zehn zu einer Erhöhung der Proteinmenge um den Faktor 2,25. Eine Erhöhung der Proteinmenge von 2,5  $\mu$ g auf 10  $\mu$ g (Faktor vier) führte zu einer Erhöhung des Proteins um den Faktor 1,7; eine Erhöhung der Proteinmenge von 10  $\mu$ g auf 25  $\mu$ g (Faktor vier) zu einer Erhöhung des Proteins um den Faktor 1,3. Die Menge des von T-Zellen in 8 h synthetisierten Immuntoxins stand folglich nicht in einem linearen Verhältnis zu der Menge der transfizierten mRNA. Dieses Ergebnis stimmt überein mit dem Anstieg der Signalstärke des eGFP in SP(i)-e23-PE38-mRNA transfizierten T-Zellen, das ebenfalls unterproportional zur verwendeten mRNA-Menge zunahm (Abbildung 8 a).

#### **4.2.2.2 Auswirkungen der Immuntoxin-Expression auf die Vitalität der transient transfizierten T-Zellen**

Eine Translokation des rekombinanten Immuntoxins in das ER ist für die Verwendung von T-Zellen als Carrier für PE38-Immuntoxine von großer Bedeutung. In Chen *et al.* (1997) wurde die Theorie aufgestellt, dass eine kotranslationale Translokation von Immuntoxin in das ER, initiiert durch ein angefügtes ER-Signalpeptid, verhindert, dass dieses sein Zielprotein, den Elongationsfaktor-2, der im Zytosol der Zelle vorliegt, binden kann (Chen *et al.*, 1997). Nach dieser Theorie wird das Immuntoxin anschließend über den sekretorischen Weg aus der Zelle geschleust, kann in der transfizierten Carrier-Zelle somit

nicht spezifisch wirken und sollte daher die Vitalität der Zelle nicht erheblich beeinträchtigen. Um zu überprüfen, ob die Vitalität der mit VEGF-PE38-mRNA transfizierten T-Zellen durch die Expression der Immuntoxine SP(i)-e23-PE38 und VEGF-PE38 beeinträchtigt war, wurden T-Zellen isoliert und vier Tage nach der Aktivierung mit unterschiedlichen Mengen SP(i)-e23-PE38-mRNA und VEGF-PE38-mRNA transfiziert.



**Abbildung 22: Vitalität der e23-PE38 und VEGF-PE38 exprimierenden T-Zellen in Abhängigkeit von der Menge der transfizierten mRNA.** (a)  $5 \times 10^6$  T-Zellen wurden mit 0,25 µg bzw. 25 µg SP(i)-e23-PE38-mRNA transfiziert und 5 h und 48 h nach der Transfektion mittels PI-Färbung im FACS analysiert. Als Kontrolle wurden nicht transfizierte T-Zellen verwendet. Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  s.d. von drei unabhängigen Versuchen, durchgeführt in Duplikaten. Sternchen repräsentieren die statistische Signifikanz ( $p \leq 0,05$ : \*,  $p \leq 0,005$ : \*\*\*). (b)  $5 \times 10^6$  T-Zellen wurden mit 0,25 µg bzw. 25 µg SP(i)-e23-PE38-mRNA transfiziert und ihre Vitalität zu den angegebenen Zeitpunkten wurden PI-Färbungen im FACS analysiert. (c)  $5 \times 10^6$  T-Zellen wurden mit 0,1 µg, 0,5 µg, 2,5 µg, 10 µg und 25 µg VEGF-PE38-mRNA transfiziert und ihre Vitalität zu den angegebenen Zeitpunkten mittels PI-Färbung im FACS analysiert. Als Kontrolle wurden nicht transfizierte T-Zellen verwendet. Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  s.d. von einem Versuch, durchgeführt in Duplikaten.

Sowohl die Vitalität der e23-PE38, als auch die Vitalität der VEGF-PE38 exprimierenden T-Zellen war in Abhängigkeit von der eingesetzten Menge an Immuntoxin-kodierender mRNA vermindert. Je mehr mRNA für die Transfektion eingesetzt wurde, desto mehr Immuntoxin wurde von den T-Zellen synthetisiert (Abbildung 21) und desto stärker war die T-Zell-Vitalität beeinträchtigt (Abbildung 22). Wurden die T-Zellen mit 0,25 µg SP(i)-e23-PE38-mRNA transfiziert, war der Anteil der lebenden T-Zellen 48 h nach der Transfektion auf  $67 \pm 7,3$  % gesunken, bei der Transfektion von 25 µg sogar auf  $19,9 \pm 4,3$  % bei einem Anteil lebender Zellen der Kontrolle von  $94,9 \pm 0,8$  % (Abbildung 22 a). Betrachtet man den zeitlichen Verlauf der Vitalität, so zeigt sich, dass die Verminderung der Vitalität nicht direkt nach der Transfektion einsetzte, sondern eine signifikante Beeinträchtigung erst verzögert, nach 24 h, zu beobachten war (Abbildung 22 a, b). Die Transfektion von T-Zellen mit 0,1 - 25 µg VEGF-PE38-mRNA führte nach 48 h zu einer Reduktion des Anteils an lebenden T-Zellen auf  $70,9 \pm 1,5$  % bei 0,1 µg mRNA zu einer Reduktion auf  $19,1 \pm 0,6$  % bei 25 µg mRNA, bei einem Anteil lebender Zellen der Kontrolle von  $95,5 \pm 0,5$  % (Abbildung 22 c). Eine starke Beeinträchtigung der T-Zell-Vitalität bei der Transfektion von  $5 \times 10^6$  T-Zellen mit nur 0,1 µg VEGF-PE38-mRNA lässt auf eine hohe Toxizität des Immuntoxins schließen (Abbildung 22). Die hohe toxische Wirkung ist ein Indikator für eine spezifische Wirkung der Immuntoxine. Die Abhängigkeit der Toxizität von der Konzentration der transfizierten mRNA-Lösung spricht ebenso für eine spezifische Wirkung der Immuntoxine (Abbildung 22 c).

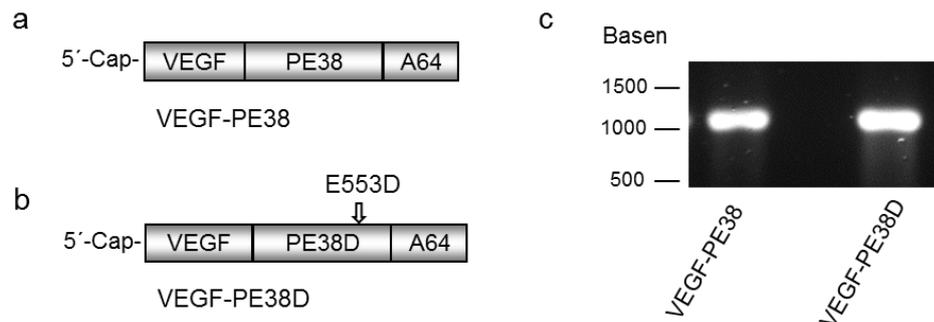
### **4.2.3 Das attenuiert Immuntoxin VEGF-PE38D**

#### **4.2.3.1 Expression von attenuiertem Immuntoxin VEGF-PE38D**

Die starke toxische Wirkung der Immuntoxine e23-PE38 und VEGF-PE38 sowohl gegenüber den Immuntoxin exprimierenden T-Zellen, als auch gegenüber den Immuntoxin exprimierenden HEK293-Zellen war vermutlich auf eine spezifische zytotoxische Wirkung des PE38 zurückzuführen. Sollte das der Fall sein, sollte die zytotoxische Wirkung durch eine Mutation im aktiven Zentrum der Toxindomäne aufgehoben werden können.

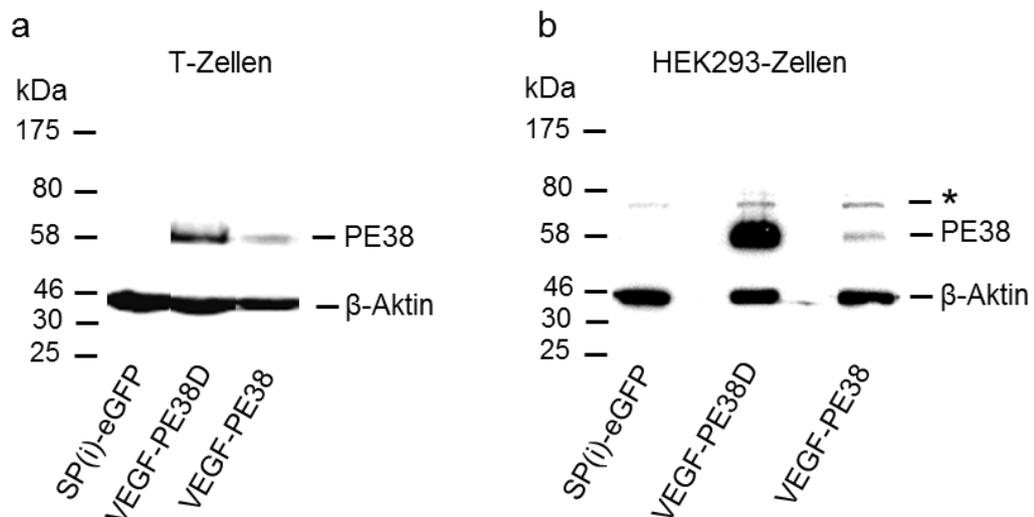
Das PEA übt seine toxische Wirkung aus, indem seine Toxindomäne den Elongationsfaktor-2 bindet und damit die Proteinbiosynthese hemmt. Für das native PEA konnte gezeigt werden, dass eine Punktmutation im aktiven Zentrum der Toxindomäne die zytotoxische Aktivität um einen Faktor von mehr als 10.000 reduziert. Dafür wurde die Glutaminsäure an Position 553 des nativen PEA, die sich im aktiven Zentrum der Toxindomäne befindet, durch eine Asparaginsäure ersetzt (Douglas *et al.*, 1987). In der

vorliegenden Arbeit wurde diese Mutation im Immuntoxin VEGF-PE38D eingeführt, indem die dem Glu<sub>553</sub> entsprechende Glutaminsäure des Immuntoxins VEGF-PE38 durch eine Asparaginsäure ersetzt wurde. Der resultierende Vektor pGEM4Z/VEGF/ PE38D/A64 wurde als Templat für die *in vitro*-Synthese der VEGF-PE38-mRNA verwendet (Abbildung 23 b). Mittels denaturierender Agarosegelelektrophorese konnte gezeigt werden, dass die VEGF-PE38D-mRNA die gleiche Länge und Uniformität hat, wie die originale VEGF-PE38-mRNA (Abbildung 23 c).



**Abbildung 23: Schematische Darstellung von VEGF-PE38-mRNA und VEGF-PE38D-mRNA. (a)** *In vitro* translatierte mRNA, die für das Immuntoxin VEGF-PE38 kodiert. **(b)** *In vitro* translatierte mRNA, die für das Immuntoxin VEGF-PE38D kodiert, das eine Punktmutation im aktiven Zentrum der Toxindomäne trägt (E553D). **(c)** Analyse von Immuntoxin-kodierender mRNA im 1,2 %igen denaturierenden Agarosegel.

Die Expression der attenuierten Immuntoxin-Variante VEGF-PE38D sollte sowohl in T-Zellen, als auch in HEK293-Zellen untersucht werden. Primäre, aktivierte T-Zellen wurden vier Tage nach der Aktivierung mit VEGF-PE38D-mRNA, die für das attenuierte Immuntoxin kodiert, und VEGF-PE38-mRNA, die für das originale Immuntoxin kodiert, transfiziert. Ebenso wurden HEK293-Zellen in Lösung mit VEGF-PE38D-mRNA und VEGF-PE38-mRNA transfiziert. Die transfizierten T-Zellen und HEK293-Zellen wurden jeweils für 8 h inkubiert und der gesamte Transfektionsansatz wurde mit dem Cell Culture Lysis-Puffer lysiert. Der Proteingehalt sowohl des T-Zell-Lysats, als auch des HEK293-Zell-Lysats wurde mittels Bradford-Assay bestimmt. Mittels SDS-PAGE wurde das Zelllysate aufgetrennt und mittels Western-Analyse und spezifischer Immunfärbung mit dem anti-PEA-Antikörper wurden die Immuntoxine nachgewiesen. Für die Detektion wurde der Western Blot mit ECL-Western Blotting Substrat entwickelt, das Chemilumineszenzsignal wurde mit dem Chemidoc XRS dokumentiert.



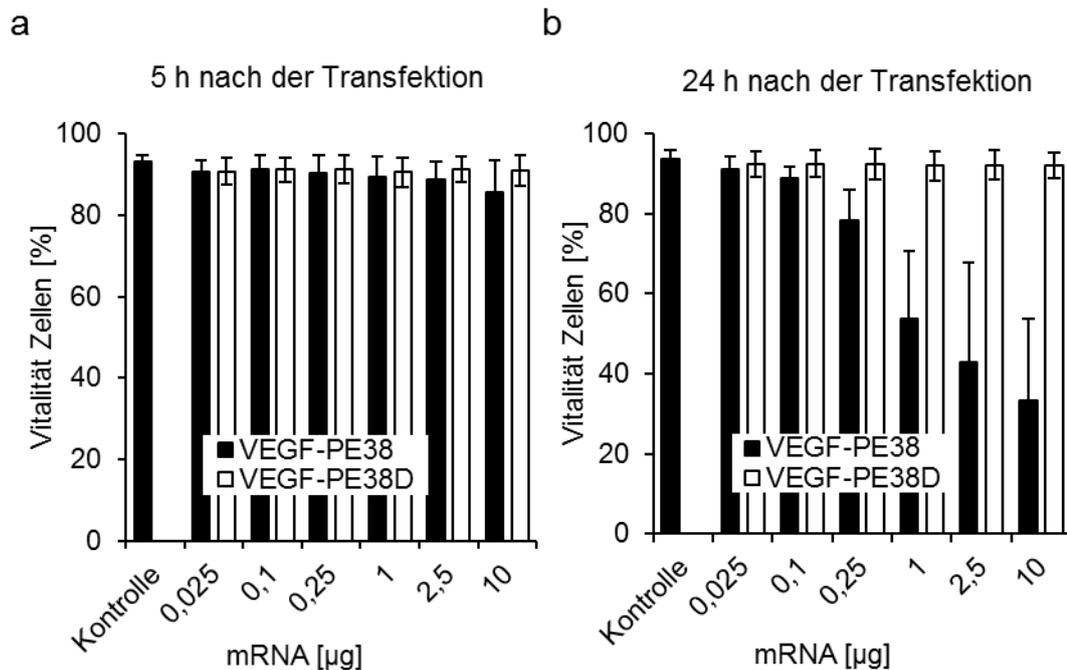
**Abbildung 24: Vorkommen der Immuntoxine VEGF-PE38 und VEGF-PE38D im Lysat von T-Zellen und HEK293-Zellen.** (a)  $5 \times 10^6$  T-Zellen wurden mit  $25 \mu\text{g}$  VEGF-PE38D-mRNA, VEGF-PE38-mRNA und SP(i)-eGFP-mRNA transfiziert und nach 10 h lysiert. Jeweils  $150 \mu\text{g}$  Protein wurden im 10 %igen SDS-Gel aufgetrennt und mittels Immunfärbung und Western-Analyse gegen die PE38-Komponente analysiert. Als Ladekontrolle wurde eine Färbung gegen  $\beta$ -Aktin durchgeführt. (b)  $5 \times 10^6$  HEK293-Zellen wurden mit  $10 \mu\text{g}$  VEGF-PE38D-mRNA, VEGF-PE38-mRNA und SP(i)-eGFP-mRNA transfiziert und nach 10 h lysiert. Jeweils  $20 \mu\text{g}$  Protein wurden im 10 %igen SDS-Gel aufgetrennt und mittels Immunfärbung und Western-Analyse gegen die PE38-Komponente analysiert. Als Ladekontrolle wurde eine Färbung gegen  $\beta$ -Aktin durchgeführt. [Abbildung modifiziert nach Eggers *et al.*, 2018]

Sowohl in T-Zellen als auch in HEK293-Zellen lagen das Immuntoxin VEGF-PE38 und dessen attenuierte Version VEGF-PE38D als vollständiges Protein mit einer Größe von jeweils circa 58 kDa vor (Abbildung 24). In den mit SP(i)-eGFP-mRNA transfizierten T-Zellen oder HEK293-Zellen konnte kein Immuntoxin nachgewiesen werden, aber da auch hier der polyklonale anti-PEA-Antikörper auf Höhe von circa 70 kDa gebunden hatte, konnte diese Bande als unspezifisch betrachtet werden (Abbildung 24 b). Für beide untersuchte Zelltypen konnte gezeigt werden, dass das mutierte Immuntoxin VEGF-PE38D deutlich stärker exprimiert wurde als das originale Immuntoxin VEGF-PE38. Dieser Effekt ist somit nicht spezifisch für T-Zellen, sondern scheint allgemein gültig zu sein. Die höhere Syntheserate des mutierten Immuntoxins VEGF-PE38D durch die beiden Zelltypen kann durch eine stark reduzierte Toxizität des Immuntoxins erklärt werden. Die Proteinsyntheserate kann als Maß für die Toxizität des PEA gewertet werden, da dieses den Elongationsfaktor-2 und damit die Proteinsyntheserate hemmt. Han & Galloway (1995) haben die ADP-Ribosyltransferase-Aktivität verschiedener rekombinanter PEA-Varianten und damit ihre Toxizität über eine Reduktion des  $[^3\text{H}]$ Leucin Einbaus in neu synthetisierte Proteine quantifiziert. Nimmt man die Proteinsyntheserate als Maß für die Toxizität des Immuntoxins, kann daraus ebenfalls auf eine starke Verminderung der Toxizität durch den

Austausch nur einer Base geschlossen werden. Vergleicht man die Menge des in T-Zellen exprimierten Immuntoxins mit der Menge des in HEK293-Zellen exprimierten Immuntoxins, so ist zu beachten, dass  $5 \times 10^6$  HEK293-Zellen mit  $10 \mu\text{g}$  VEGF-PE38-mRNA bzw. VEGF-PE38D-mRNA transfiziert wurden. Im Vergleich dazu wurden  $5 \times 10^6$  T-Zellen mit jeweils  $25 \mu\text{g}$  mRNA transfiziert und die 7,5-fache Menge Protein des T-Zell-Lysats in der SDS-PAGE aufgetrennt wurde (Abbildung 24) konnte damit gezeigt werden, dass das Immuntoxin VEGF-PE38 sowie seine mutierte Variante VEGF-PE38D in HEK293-Zellen um ein Vielfaches stärker exprimiert wurde, als in T-Zellen.

#### **4.2.3.2 Einfluss der Mutation des aktiven Zentrums von VEGF-PE38 auf die Vitalität der transfizierten T-Zellen**

Mittels Western-Analyse konnte gezeigt werden, dass sowohl T-Zellen, als auch HEK293-Zellen das mutierte Immuntoxin vollständig synthetisieren (Abbildung 24). Im Folgenden sollte untersucht werden, welchen Einfluss die Mutation im katalytischen Zentrum der Toxindomäne des Immuntoxins VEGF-PE38 auf die transfizierten T-Zellen hatte. Dazu wurden T-Zellen vier Tage nach der Aktivierung mit unterschiedlichen Mengen an VEGF-PE38D-mRNA, die für das attenuierte Immuntoxin kodierte, und zur Kontrolle mit VEGF-PE38-mRNA transfiziert. Die Vitalität der transfizierten T-Zellen, die das attenuierte oder das originale Immuntoxin exprimierten, wurde mittels PI-Färbung und Durchflusszytometrie bestimmt.

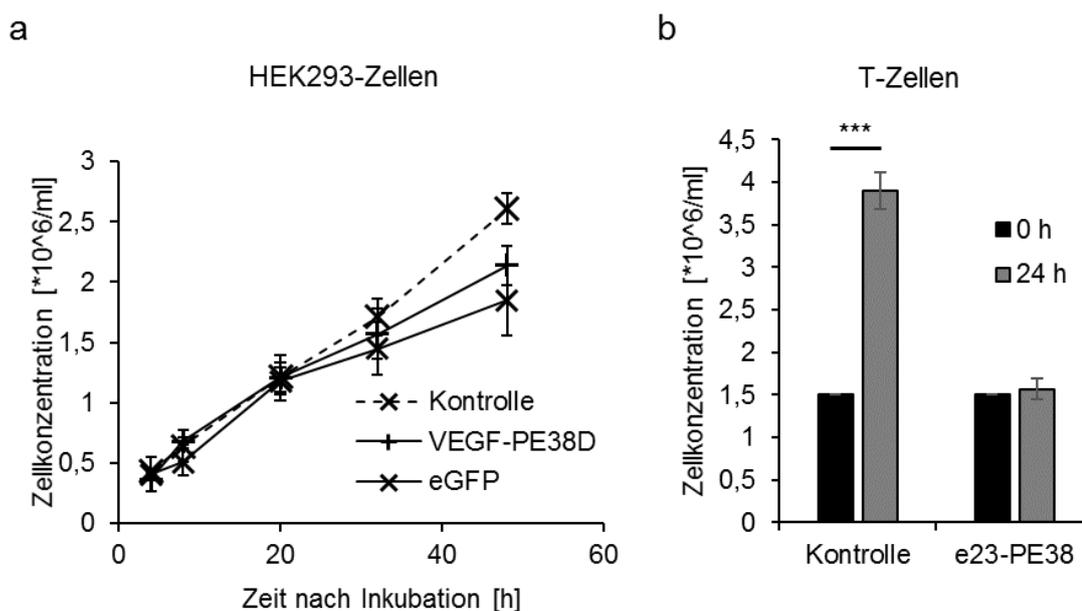


**Abbildung 25: Vitalität von T-Zellen in Abhängigkeit von der Expression von attenuiertem Immuntoxin VEGF-PE38D.** (a, b)  $5 \times 10^6$  T-Zellen wurden mit 0,025 µg, 0,1 µg, 0,25 µg, 1 µg, 2,5 µg und 10 µg VEGF-PE38-mRNA und VEGF-PE38D-mRNA transfiziert und nach 5 h (a) bzw. 24 h (b) mittels PI-Färbung im FACS analysiert. Nicht transfizierte T-Zellen dienten als Kontrolle. Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  s.d. von zwei unabhängigen Experimenten, durchgeführt in Duplikaten. [Abbildung modifiziert nach Eggers *et al.*, 2018]

Weder bei T-Zellen, die VEGF-PE38 exprimierten, noch bei T-Zellen, die das attenuierte VEGF-PE38D exprimierten, konnte innerhalb von 5 h nach der Transfektion eine signifikante Verminderung der T-Zell-Vitalität beobachtet werden (Abbildung 25 a). 24 h nach der Transfektion konnte für das originale Immuntoxin VEGF-PE38 eine Verminderung der Vitalität der T-Zellen gemessen werden, die von der eingesetzten Menge Immuntoxin kodierender mRNA abhängig war (Abbildung 25 b). Im Unterschied dazu blieb die Vitalität von T-Zellen, die die attenuierte Variante des Immuntoxins VEGF-PE38D exprimierten, stabil. Auch die Transfektion von 10 µg VEGF-PE38D-mRNA führte nach 24 h zu keiner Beeinträchtigung der Vitalität der transfizierten Zellen ( $92 \pm 3,1\%$ ) im Vergleich mit nicht transfizierten T-Zellen ( $93,5 \pm 2,2\%$ ) (Abbildung 25 b). Dagegen war die Vitalität der mit 10 µg VEGF-PE38-mRNA transfizierten T-Zellen nach 24 h auf  $32,3 \pm 20,6\%$  gesunken. Die zytotoxische Wirkung des VEGF-PE38 konnte somit durch den Austausch einer einzelnen Aminosäure, die eine Hemmung des aktiven Zentrums der Toxindomäne bewirkt, aufgehoben werden. Das spricht für eine spezifische Wirkung des Immuntoxins.

Die Proliferationsrate der Immuntoxin exprimierenden Zellen gibt ebenfalls Aufschluss über die toxische Wirkung der Immuntoxine gegenüber den T-Zellen (Han & Galloway, 1995). Um den Effekt des attenuierten Immuntoxins VEGF-PE38D zu

untersuchen, wurden HEK293-Zellen mit VEGF-PE38D-mRNA und mit SP(i)-eGFP-mRNA transfiziert und deren Zellzahlen mit den Zellzahlen der nicht transfizierten HEK293-Zellen verglichen. Dem eGFP war, wie dem Immuntoxin, ein ER-Signalpeptid für die Translokation des Proteins in das ER vorangestellt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellzahlen mit dem CASY-Cell Counter bestimmt. Die Proliferationsrate von T-Zellen, die das Immuntoxin e23-PE38 exprimierten, wurde ebenfalls untersucht, indem die Zellen an Tag vier nach der Aktivierung mit SP(i)-e23-PE38-mRNA transfiziert, anschließend für 24 h kultiviert und die Zellzahlen mit dem CASY-Cell Counter bestimmt wurden.



**Abbildung 26: Proliferation von HEK293-Zellen und T-Zellen in Abhängigkeit von der Expression der Immunttoxine.** (a)  $5 \times 10^6$  HEK293-Zellen wurden mit  $25 \mu\text{g}$  VEGF-PE38D-mRNA und  $25 \mu\text{g}$  SP(i)-eGFP-mRNA transfiziert, nicht transfizierte T-Zellen dienten als Kontrolle. Die Zellzahl wurde nach 4 h, 8 h, 20 h, 32 h und 48 h bestimmt. Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  s.d. von zwei unabhängigen Experimenten, durchgeführt in Duplikaten. (b)  $5 \times 10^6$  T-Zellen wurden mit  $25 \mu\text{g}$  SP(i)-e23-PE38D-mRNA transfiziert, nicht transfizierte Zellen dienten als Kontrolle. Nach 24 h Inkubation wurde die Zellzahl bestimmt. Die Werte für 0 h wurden theoretisch bestimmt. Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  s.d. von drei unabhängigen Experimenten, durchgeführt in Duplikaten. Sternchen repräsentieren die statistische Signifikanz ( $p \leq 0,005$ : \*\*\*).

Die Proliferation von HEK293-Zellen, die das attenuierte Immuntoxin VEGF-PE38D oder das eGFP exprimierten, war über einen Zeitraum von 48 h gegenüber der Kontrolle nur leicht vermindert (Abbildung 26 a). Da die rekombinante Expression von eGFP in der Regel nicht toxisch ist, kann die leichte Verminderung der Proliferation sowohl der das eGFP exprimierenden, als auch der das attenuierte Immuntoxin exprimierenden HEK293-Zellen durch unspezifische Effekte der rekombinanten Proteine erklärt werden. Im Unterschied dazu war die Proliferation der T-Zellen, die das Immuntoxin e23-PE38 exprimierten, gegenüber der Proliferation von nicht transfizierten T-Zellen stark vermindert (Abbildung 26 b). Vom vierten auf den fünften Tag nach der Aktivierung mit MACSiBeads,

damit über einen Zeitraum von 24 h, vervielfachte sich die Zellzahl der mit IL-2 versetzten T-Zellen um den Faktor 2,6. Im Unterschied dazu stieg die Zellzahl der mit 25 µg SP(i)-e23-PE38-mRNA transfizierten T-Zellen im gleichen Zeitraum nicht signifikant (Faktor 1,05) an (Abbildung 26 b). Eine Proliferation der T-Zellen, die das Immuntoxin e23-PE38 exprimierten, konnte somit nicht gezeigt werden.

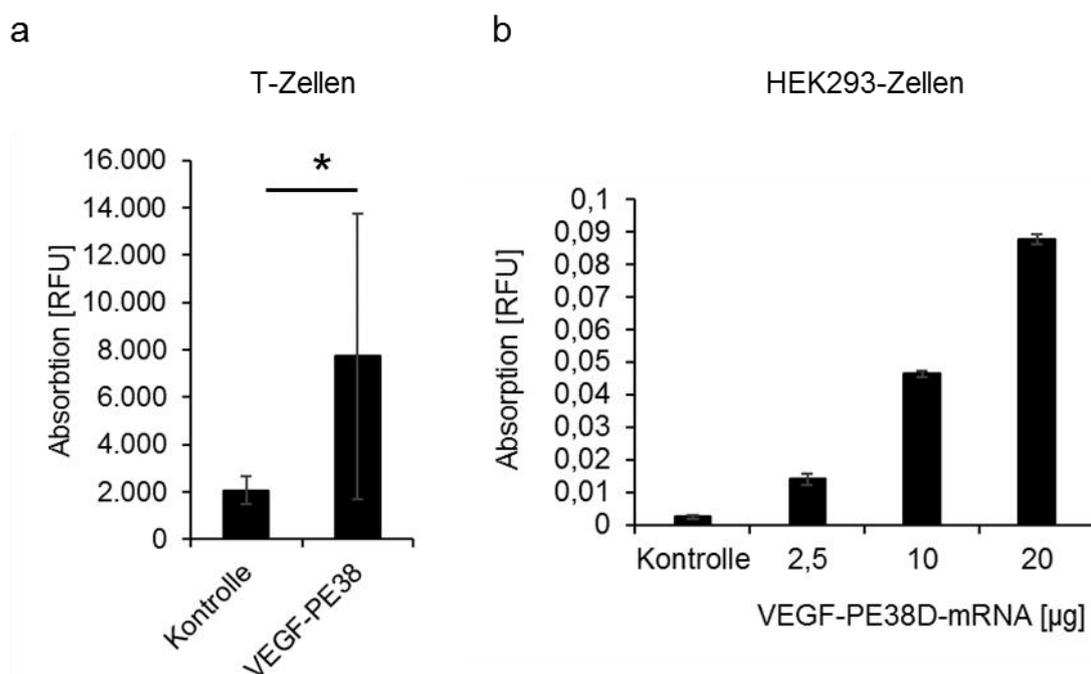
## 4.2.4 Sekretion des Immuntoxins VEGF-PE38D

### 4.2.4.1 Sekretion des Immuntoxins VEGF-PE38D durch T-Zellen und HEK293-Zellen

Eine effiziente Sekretion des Immuntoxins durch die T-Zellen bildet die Voraussetzung für die Anwendung der T-Zellen im Rahmen der hier geplanten Kombination aus adoptiver T-Zell-Therapie und Immuntherapie. Deshalb sollte im Folgenden die Sekretion des Immuntoxins untersucht werden. Für das native VEGF<sub>165</sub> wird allgemein angenommen, dass es kotranslational in das Lumen des ER transloziert wird, wobei sein N-terminales Signalpeptid SP(v) proteolytisch abgespalten wird. Anschließend wird das VEGF über den konstitutiven Sekretionsweg aus der Zelle transportiert (Guzmán-Hernández *et al.*, 2014). Für das hier verwendete Konjugat VEGF-PE38, sollte das dem VEGF<sub>165</sub> N-terminal vorangestellte intrinsische Signalpeptid SP(v) die Translokation und anschließende Sekretion des gesamten Immuntoxins initiieren. Nachdem die Immuntoxine mittels Western-Analyse im Zelllysats nachgewiesen wurden, sollten sie, um eine Sekretion der Immuntoxine zu zeigen, ebenfalls im Überstand der Zellkultur nachgewiesen werden. Die Detektion von VEGF-PE38 oder e23-PE38 im Kulturüberstand von mRNA-transfizierten T-Zellen mittels Western-Analyse war in der vorliegenden Arbeit nicht möglich, da der polyklonale anti-PEA-Antikörper auf Höhe der Immuntoxine eine starke Bande anfärbte, die zudem in serumfreiem Medium zu detektieren war (Daten nicht gezeigt). Für HEK293-Zellen, die mit einem Immuntoxin kodierenden Plasmid transfiziert wurden, konnten Menzel *et al.* (2008) das vollständige Immuntoxin im Zellkulturüberstand mittels Western-Analyse nachweisen (Menzel *et al.*, 2008). Dafür musste aber das Immuntoxin mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt werden, um unspezifische Signale zu minimieren. In einer anderen Studie konnte mittels ELISA mit dem nicht aufgereinigten Zellkulturüberstand die Sekretion eines VEGF-PE38-Immuntoxins durch hMSC-ähnlichen Zellen nachgewiesen werden (Hu *et al.*, 2009). Deshalb sollte die Sekretion des Immuntoxins VEGF-PE38 im Folgenden mittels Sandwich-ELISA analysiert werden. Ein Protokoll für den Nachweis des Immuntoxins VEGF-PE38 im Sandwich-ELISA wurde in Ermangelung eines Standardproteins mit dem zellfreien Kulturüberstand von mit VEGF-PE38-mRNA transfizierten

T-Zellen erstellt. Das Immuntoxin mittels zellfreier Genexpression zu synthetisieren war keine Option, da das PE38 den Elongationsfaktor-2 hemmt und damit die *in vitro* - Proteinsynthese verhindern würde.

Um die Sekretion des Immuntoxins VEGF-PE38 durch T-Zellen zu ermitteln, wurden T-Zellen isoliert und an Tag vier nach der Aktivierung mit VEGF-PE38-mRNA transfiziert. Der Kulturüberstand wurde nach einer Inkubation von 8 h zellfrei geerntet und ein Sandwich-ELISA mit dem in Material und Methoden beschriebenen Protokoll durchgeführt, das Signal wurde im ELISA-Reader detektiert.

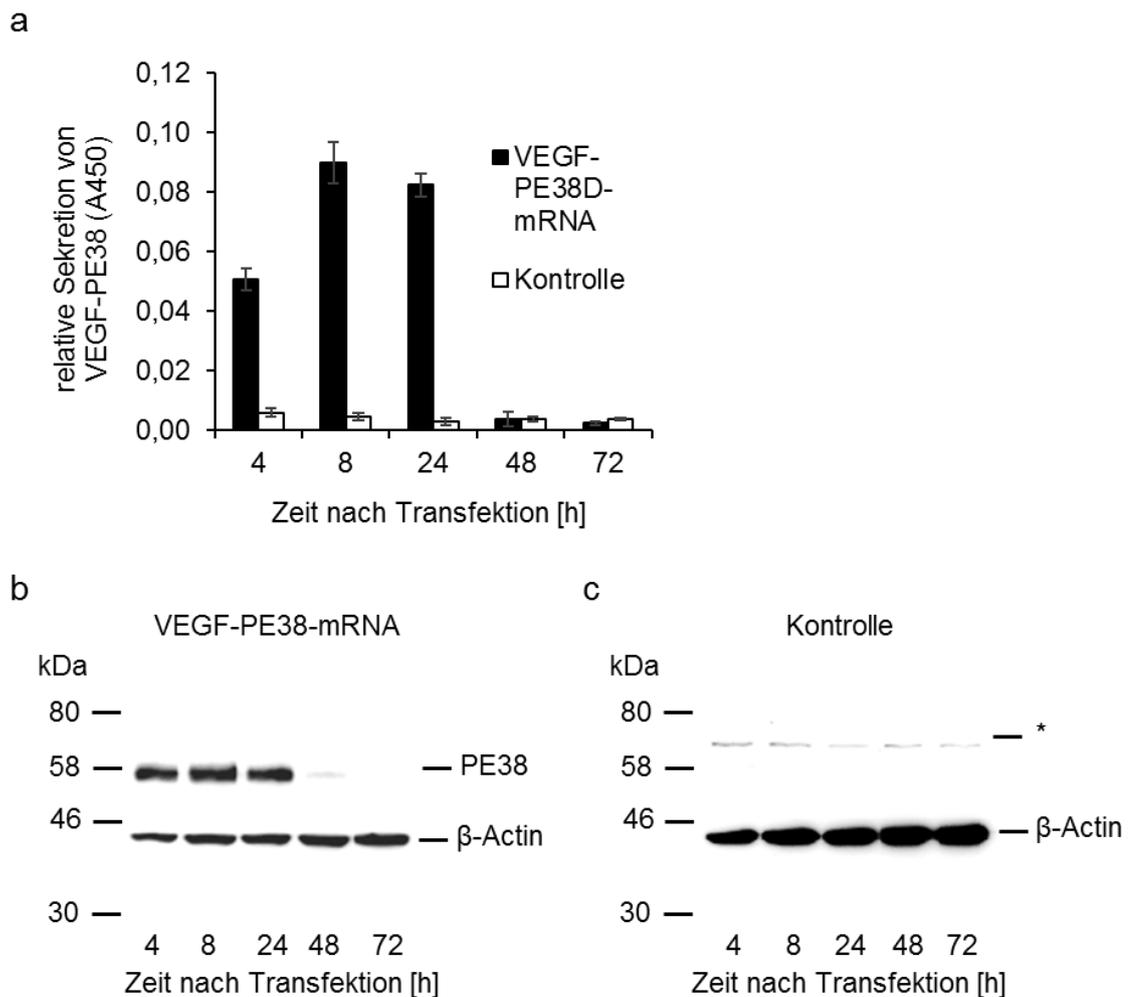


**Abbildung 27: Vorkommen von VEGF-PE38 und VEGF-PE38D im Überstand von T-Zellen und HEK293-Zellen. (a)**  $5 \times 10^6$  T-Zellen wurden mit  $25 \mu\text{g}$  VEGF-PE38-mRNA transfiziert und der Kulturüberstand nach 8 h mittels Sandwich-ELISA analysiert. Nicht transfizierte T-Zellen dienen als Kontrolle. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  s.d. von drei unabhängigen Experimenten, durchgeführt in Quadruplikaten. Sternchen repräsentieren die statistische Signifikanz ( $p \leq 0,05$ : \*). **(b)**  $5 \times 10^6$  HEK293-Zellen wurden mit  $2,5 \mu\text{g}$ ,  $10 \mu\text{g}$  und  $20 \mu\text{g}$  VEGF-PE38D-mRNA transfiziert und der Kulturüberstand nach 8 h mittels Sandwich-ELISA analysiert. Nicht transfizierte Zellen dienen als Kontrolle. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  s.d. eines Experiments, durchgeführt in Triplikaten.

Das Immuntoxin VEGF-PE38 konnte mittels Sandwich-ELISA im zellfreien Kulturüberstand von T-Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 27 a). Allerdings war trotz einer Transfektion von  $25 \mu\text{g}$  mRNA die Standardabweichung des Immuntoxin-Signals, das kolorimetrisch mit der TMB-Substrat-Lösung nachgewiesen wurde, sehr hoch. Eine Erhöhung der Konzentration des Immuntoxins im Zellkulturmedium über eine Erhöhung der T-Zell-Konzentration in der Kultur wurde als nicht sinnvoll betrachtet, da schon eine Transfektion mit  $0,25 \mu\text{g}$  VEGF-PE38-mRNA bei verdoppelter T-Zell-Konzentration zu einer signifikanten Reduktion der transfizierten T-Zellen führte (Daten nicht gezeigt). Um die

Detektion im Sandwich-ELISA zu erleichtern, sollte ebenfalls die Sekretion des attenuierten Immuntoxins VEGF-PE38D durch HEK293-Zellen nach Transfektion mit VEGF-PE38D-mRNA untersucht werden. Für die Mutation der Aminosäure 533 im PEA wird angenommen, dass diese nicht zu einer Änderung der Konformation führt (Lukac & Collier, 1988). Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit davon ausgegangen, dass das Einfügen der entsprechenden Punktmutation im Immuntoxin ebenfalls zu keiner Konformationsänderung führt und der Mechanismus der Prozessierung und der Sekretion nicht beeinträchtigt war. Da es sich bei beiden Zelltypen um humane Zellen handelt, wurde außerdem davon ausgegangen, dass der Mechanismus der Sekretion bei HEK293-Zellen wie bei T-Zellen abläuft. Da bei HEK293-Zellen eine höhere Proteinexpression beobachtet wurde (Abbildung 24) war bei deren Einsatz eine zuverlässigere Detektion zu erwarten. Um das Signal zusätzlich zu erhöhen, wurde zudem eine andere Methode der Bildgebung gewählt, der ELISA wurde mit dem QuantaRed-Enhanced-Chemifluorescent-HRP-Substrat entwickelt. Dieser lumineszente Assay ist deutlich sensitiver als der kolorimetrische Nachweis des HRP-konjugierten Antikörpers mit der TMB-Substrat-Lösung. Durch Expression von attenuiertem VEGF-PE38D in HEK293-Zellen konnte gezeigt werden, dass die Menge des sekretierten Immuntoxins 8 h nach der Transfektion von der Menge der transfizierten mRNA abhängig war (Abbildung 27 b). Wie beim Nachweis des Immuntoxins im Zelllysate galt, je mehr mRNA eingesetzt wurde, desto mehr Immuntoxin konnte im Kulturüberstand nachgewiesen werden. Über eine Variation der zu transfizierenden mRNA ließ sich somit die Menge des sekretierten Immuntoxins variieren.

Bei einer T-Zell-Therapie ist die Dauer und der Zeitpunkt der Freisetzung des therapeutischen Toxins von großer Bedeutung, weshalb im Folgenden der zeitliche Verlauf der Expression und der Sekretion der Immuntoxine untersucht werden sollte. Dazu wurde die Menge des attenuierten Immuntoxins VEGF-PE38D im Zelllysate und im Kulturüberstand von HEK293-Zellen analysiert. Dafür wurden HEK293-Zellen mit VEGF-PE38D-mRNA transfiziert, der Kulturüberstand der mit VEGF-PE38D-mRNA transfizierten HEK293-Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten zellfrei geerntet und die Menge des sekretierten Immuntoxins im Sandwich-ELISA analysiert. Der Sandwich-ELISA wurde mit dem QuantaRed Enhanced Chemifluorescent HRP-Substrat entwickelt und mit dem Modulus-Fluoreszenzreader detektiert. Für die Analyse der Immuntoxin-Expression wurde die Proteinkonzentration des Zelllysates mittels Bradford-Assay bestimmt und das HEK293-Zelllysate in einer Gel-Elektrophorese aufgetrennt. Das Immuntoxin wurden mittels Western-Analyse und einer spezifischen Immunfärbung gegen die PE38-Untereinheit des VEGF-PE38D detektiert. Der Western Blot wurde mit dem ECL-Western Blotting Substrat inkubiert und das Chemilumineszenzsignal mit dem Chemidoc XRS dokumentiert.



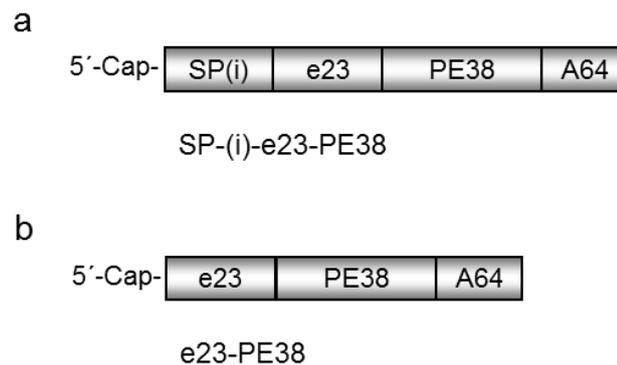
**Abbildung 28: Zeitlicher Verlauf der Expression und Sekretion von VEGF-PE38D durch HEK293-Zellen.** (a)  $5 \times 10^6$  HEK293-Zellen wurden mit  $25 \mu\text{g}$  VEGF-PE38D-mRNA transfiziert und das Immuntoxin VEGF-PE38D im zellfreien Kulturüberstand zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Transfektion mittels Sandwich-ELISA detektiert. Nicht transfizierte Zellen dienten als Kontrolle. Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  s.d. von vier Experimenten. (b, c)  $5 \times 10^6$  HEK293-Zellen wurden mit  $25 \mu\text{g}$  VEGF-PE38D-mRNA transfiziert (b) oder nicht transfiziert (c) und die Zellen wurden nach den angegebenen Zeiträumen lysiert. Jeweils  $20 \mu\text{g}$  Protein wurden im 10 %igen SDS-Gel aufgetrennt und das Immuntoxin mittels Western Blot und Immunfärbung gegen die PE38-Komponente nachgewiesen. Als Ladekontrolle wurde eine Immunfärbung gegen das  $\beta$ -Aktin durchgeführt. [Abbildung modifiziert nach Eggers *et al.*, 2018]

Mittels Sandwich-ELISA konnte über einen Zeitraum von 4 h bis 24 h nach der Transfektion von HEK293-Zellen mit VEGF-PE38D-mRNA eine signifikante Menge des attenuierten Immuntoxins im zellfreien Kulturüberstand nachgewiesen werden (Abbildung 28 a). Damit kann davon ausgegangen werden, dass das VEGF-PE38 sekretiert wird. Weil für das in T-Zellen exprimierte Immuntoxin kein Referenzprotein zur Verfügung stand, war es nicht möglich, das sekretierte Immuntoxin zu quantifizieren. Nach 4 h Inkubation waren gut 50 % der maximalen Menge an Immuntoxin VEGF-PE38D im Kulturüberstand nachzuweisen, die maximale Menge an VEGF-PE38D war in einem Zeitraum von 8 h bis

24 h nach der Transfektion erreicht. Anschließend konnte kein Immuntoxin mehr im Kulturüberstand detektiert werden (Abbildung 28 a). Die Analyse des Immuntoxins im Zelllysate mittels Western-Analyse ergab einen vergleichbaren zeitlichen Verlauf. Schon 4 h nach der Transfektion war eine große Menge VEGF-PE38D im Zelllysate von VEGF-PE38D exprimierenden HEK293-Zellen nachzuweisen. 8 h und 24 h nach der Transfektion war die Menge maximal und 48 h nach der Transfektion war nur eine kleine Menge des Immuntoxins detektierbar (Abbildung 28 b). Die Menge des als Ladekontrolle detektierten  $\beta$ -Aktin nahm, trotz jeweils 20  $\mu$ g aufgetragenem Protein, über den Zeitraum der Kultivierung von 72 h sowohl bei der Probe des VEGF-PE38D exprimierenden, als auch bei der Kontrolle zu (Abbildung 28 c, vergleiche Abbildung 24 b). Die mit \* markierte Bande ist ein unspezifisches Signal des anti-PEA-Antikörpers auf Höhe von circa 70 kDa (Abbildung 28 c). Durch eine Transfektion mit Immuntoxin kodierender mRNA konnte hiermit eine über einen Zeitraum von 24 h relativ konstante Freisetzung des Immuntoxins durch HEK293-Zellen erreicht werden.

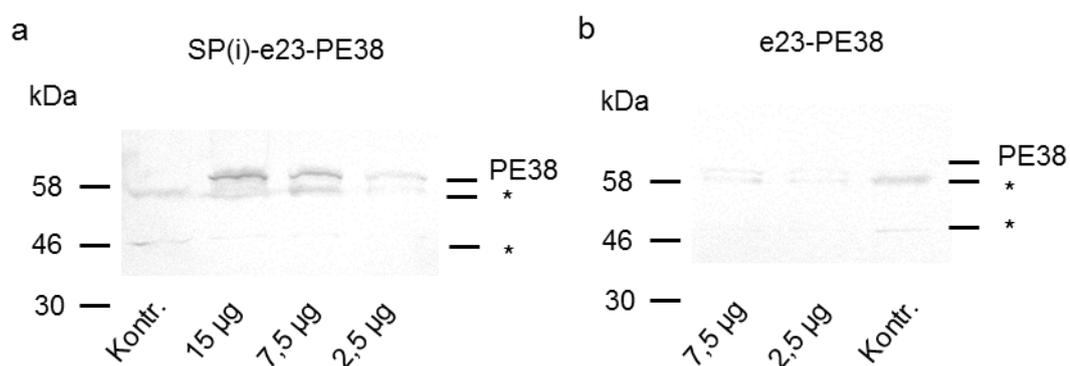
#### **4.2.4.2 Einfluss des ER-Signalpeptids von IFN $\gamma$ auf die Expression von Immuntoxin e23-PE38 in T-Zellen**

Für die Expression von mRNA kodiertem eGFP in T-Zellen und HEK293-Zellen konnte gezeigt werden, dass ein Anfügen von ER-Signalpeptiden von IFN $\gamma$ , IL-2 und TGF- $\beta$ -2 eine Translokation des rekombinanten Proteins in das ER initiierte (Abbildung 13 d). Da das Immuntoxin im Zytosol wirkt, sollte zu erwarten sein, dass ein direkt im Zytosol exprimiertes Immuntoxin deutlich toxischer ist als ein Immuntoxin, das kotranslational in das ER transportiert wird. Um das zu überprüfen, wurde die Auswirkung der Expression des Immuntoxins e23-PE38, dem das ER-Signalpeptid von IFN $\gamma$  angefügt war, mit der Auswirkung der Expression von e23-PE38 ohne ER-Signalpeptid verglichen. Dafür wurde das Plasmid pGEM4Z/E23/PE38/A64 konstruiert, das für das Immuntoxin e23-PE38 ohne ER-Signalpeptid kodierte; die *in vitro* translatierte mRNA ist in Abbildung 29 dargestellt.



**Abbildung 29: Schematische Darstellung von e23-PE38-mRNA und SP(i)-e23-PE38-mRNA.** (a) *In vitro* translatierte mRNA, die für das Immuntoxin e23-PE38 kodiert, das in das ER transportiert werden soll. (b) *In vitro* translatierte mRNA, die für das Immuntoxin e23-PE38 kodiert, das im Zytosol exprimiert werden soll.

Um den Einfluss des Signalpeptids auf die Toxizität des durch die T-Zellen synthetisierten Immuntoxins auf die T-Zellen selbst zu untersuchen, wurden T-Zellen isoliert und an Tag drei nach der Aktivierung mit verschiedenen Mengen SP(i)-e23-PE38-mRNA und e23-PE38-mRNA transfiziert. Nach einer Inkubation von 24 h wurden die Zellen geerntet und mit dem Cell Culture Lysis-Puffer lysiert. Mittels Bradford-Assay wurde die Proteinkonzentration des Zelllysats bestimmt und das Zelllysate wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Das Immuntoxin wurde mittels Western-Analyse und einer spezifischen Immunfärbung mit dem anti-PEA-Antikörper nachgewiesen. Die Immunfärbungen wurden mit der Diaminobenzidin-Lösung entwickelt und mit der E-Box dokumentiert.



**Abbildung 30: Expression von Immuntoxin e23-PE38 in T-Zellen mit und ohne ER-Signalpeptid von IFN $\gamma$ .**  $5 \times 10^6$  T-Zellen wurden mit den angegebenen Mengen e23-PE38-mRNA (a) bzw. SP(i)-e23-PE38-mRNA (b) transfiziert und nach 24 h lysiert. Jeweils 35  $\mu$ g Protein wurden im 10 %igen SDS-Gel aufgetrennt und mittels Western Blot und Immunfärbung gegen die PE38-Komponente wurde das VEGF-PE38 detektiert.

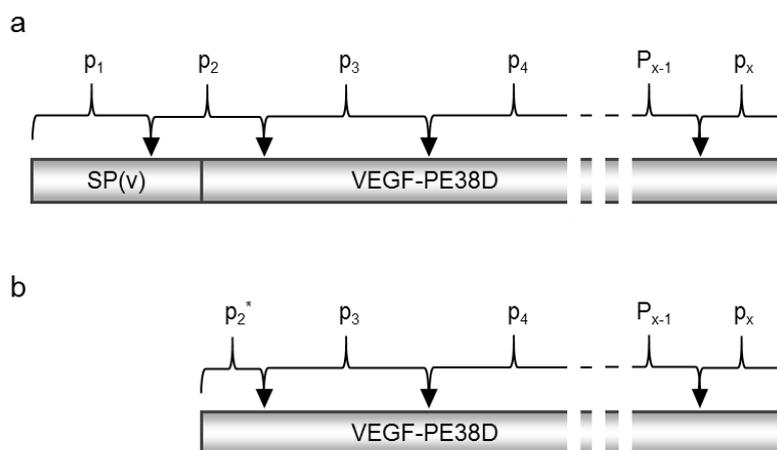
Sowohl die Expression von durch die e23-PE38-mRNA kodiertem, als auch die Expression von durch SP(i)-e23-PE38-mRNA kodiertem Immuntoxin e23-PE38 konnte in einer Western-Analyse nachgewiesen werden (Abbildung 30 a, b). Für beide Varianten konnte eine Abhängigkeit der Expression von der Menge der eingesetzten mRNA gezeigt

werden. Es kann davon ausgegangen werden, dass das zytosolisch exprimierte Immuntoxin e23-PE38 vollständig von den T-Zellen synthetisiert wurde, da sich im Western Blot auf einer Höhe von circa 65 kDa eine „einheitliche“ Bande nachweisen ließ (Abbildung 30 b). Die Variante des Immunttoxins, die durch SP(i)-e23-PE38-mRNA kodiert war, wurde deutlich stärker exprimiert, als die Variante, die durch e23-PE38-mRNA kodiert war. Das kann darauf zurückzuführen sein, dass das Anfügen des ER-Signalpeptids die Toxizität des durch die T-Zellen synthetisierten Immunttoxins e23-PE38 gegenüber den T-Zellen reduziert hat, was in der Folge zu einer Reduktion der Proteinbiosynthese führen würde. Die Vitalität der Immuntoxin exprimierenden T-Zellen wurde 5 h und 24 h nach der Transfektion mittels PI-Färbung im FACS bestimmt. Die Vitalität der mit SP(i)-e23-PE38-mRNA und e23-PE38-mRNA transfizierten T-Zellen war nach 24 h jeweils stark reduziert, wobei die Expression des Immunttoxins ohne ER-Signalpeptid weniger reduziert war (Daten nicht gezeigt). Die mit \* markierten Banden auf Höhe von circa 35 und 46 kDa zeigten unspezifische Färbungen durch den anti-PEA-Antikörper.

#### 4.2.4.3 Posttranslationale Prozessierung von VEGF-PE38D

Wird davon ausgegangen, dass das Immuntoxin spezifisch auf die T-Zellen wirkt, so muss folglich davon ausgegangen werden, dass mindestens die Toxindomäne des Immunttoxins in das Zytosol der T-Zelle gelangt. Dies kann zum Beispiel dadurch bewirkt werden, dass das Immuntoxin nicht korrekt in das ER transportiert wird. Die Translokation von nativem VEGF<sub>165</sub> in das ER wird eingeleitet durch das ER-Signalpeptid, das der Proteinsequenz des VEGF<sub>165</sub> N-terminal vorangestellt ist. Das intrinsische ER-Signalpeptid des VEGF<sub>165</sub> (SP(v)) ist 26 Aminosäuren lang (Tabelle 18). Während der Translokation von Protein in das Lumen des ER wird das Signalpeptid durch die in der ER-membran lokalisierte Signalpeptidase und das Protein wird in das ER geleitet. Bei einem Protein, bei dem das ER-Signalpeptid korrekt abgespalten wurde, kann folglich davon ausgegangen werden, dass das Protein erfolgreich in das ER transportiert wurde. Befindet sich das Signalpeptid dagegen noch am Protein, kann davon ausgegangen werden, dass das Protein nicht korrekt in das ER-Lumen transportiert wurde und sich wahrscheinlich noch im Zytosol befindet. Aufgrund dieser Hypothese sollte über das Vorhandensein des ER-Signalpeptids am Immuntoxin untersucht werden, ob dieses korrekt in das ER importiert wurde. Um ein möglicherweise am Immuntoxin verbleibendes ER-Signalpeptid nachzuweisen, wurde die Massenspektrometrie eingesetzt. Mit dieser Methode kann der Verbleib des nur 26 Aminosäuren langen Signalpeptids SP(v), der nur einen geringen Einfluss auf die Gesamtmasse des Immunttoxins hat, detektiert werden. Für die MALDI-ToF-Analyse wurde das zu untersuchende Immuntoxin VEGF-PE38D mittels Trypsin-

Verdau spezifisch geschnitten, so dass sich ein definiertes Muster an Polypeptiden ergab, das auch theoretisch mit der Software Skyline 3.5 berechnet wurde (MacLean *et al.*, 2010). Da das Signalpeptid SP(v) den N-terminalen Teil des VEGF-PE38 bildet, waren die N-terminalen Fragmente von Interesse. Für das Immuntoxin bei dem das SP(v) von VEGF<sub>165</sub> nicht abgespalten war, ergaben sich die N-terminalen Fragmente p<sub>1</sub> (Aminosäuren 1 - 22; Masse: 2692 Da) und p<sub>2</sub> (Aminosäuren 23 - 42; Masse: 2133 Da) (Abbildung 31 a). Wurde davon ausgegangen, dass das ER-Signalpeptid des VEGF<sub>165</sub> vom Immuntoxin abgespalten war, so ergab sich als N-terminales Fragment p<sub>2</sub><sup>\*</sup> (Aminosäure 27 - 42; Masse: 1659 Da) (Abbildung 31 b).



**Abbildung 31: Schematische Darstellung der N-terminalen Peptidfragmente von VEGF-PE38D mit und ohne ER-Signalpeptid SP(v).** (a) Trypsin-Verdau von VEGF-PE38D mit ER-Signalpeptid SP(v) ergibt die N-terminalen Fragmente p<sub>1</sub>, p<sub>2</sub>, p<sub>3</sub> und folgende. (b) Trypsin-Verdau von VEGF-PE38D ohne ER-Signalpeptid SP(v) ergibt die N-terminalen Fragmenten p<sub>2</sub><sup>\*</sup>, p<sub>3</sub> und folgende. (a, b) Trypsin-Schnittstellen sind mit Dreiecken dargestellt.

Für die MALDI-ToF-Analyse wurde das Immuntoxin VEGF-PE38D, um eine ausreichend hohe Ausbeute an Zielprotein zu erhalten, in HEK293-Zellen exprimiert. Dabei wurde davon ausgegangen, dass die Mutation im aktiven Zentrum des PE38 keinen Einfluss auf die Prozessierung hat und diese in HEK293-Zellen wie in T-Zellen abläuft. Für die MALDI-ToF-Analyse des VEGF-PE38D wurden 5 x 10<sup>6</sup> HEK293-Zellen mit 25 µg VEGF-PE38D-mRNA transfiziert. Die HEK293-Zellen zweier Transfektionsansätze wurden geerntet, gewaschen und mittels Ultraschall lysiert. Das Zelllysate wurde anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die das Immuntoxin enthaltende Bande aus dem Gel ausgeschnitten. Das Immuntoxin wurde einem In-Gel-Trypsin-Verdau unterzogen und die resultierenden Fragmente wurden mittels „solvent-based-peptide-extraction“ Methode aus dem Gelstück extrahiert. Nach einer Ankonzentration der Peptidlösungen wurden diese mit C<sub>18</sub> Zip Tip filter Tips auf eine 384 MALDI-Platte aufgetragen und die Massenspektrometrie mit dem 4800 MALDI-ToF/ToF<sup>TM</sup> Analyzer durchgeführt. Im 4800 MALDI-ToF/ToF<sup>TM</sup>

Analyser wurden Proteine mit einer Masse zwischen 500 Da und 4000 Da analysiert, indem 2500 Lasershots pro Probe appliziert wurden. Sekundäre Fragment-Ionen von  $p_2$  and  $p_2^*$  wurden mittels MS/MS-Scan erzeugt und analysiert, um die Peptidsequenzen der Fragment-Ionen zu bestätigen. Die MS/MS-Vorläuferionen wurden mittels „time ion selection“ ausgewählt, die eine Massedetektion von Tochterionen mit einer Abweichung von -2 bis +5 Da erlaubte. Die Fragmentierung der Vorläuferionen für den MS/MS-Scan wurde mittels „peptid in-source decay“ durch eine Fragmentierungsspannung von 1 kV initiiert, bei dem 5000 Lasershots pro Probe appliziert wurden.

**Tabelle 22: Detektion der N-terminalen Peptidfragmente von VEGF-PE38D mittels MALDI-ToF.**  $5 \times 10^6$  HEK293-Zellen wurden mit 25  $\mu\text{g}$  VEGF-PE38D-mRNA transfiziert und für 8 h inkubiert. 100  $\mu\text{g}$  Protein des Zelllysats wurden im 10 %igen SDS-Gel aufgetrennt und die Immuntoxin-Fraktion massenspektrometrisch mittels MALDI-ToF analysiert. Dargestellt sind die detektierten Fragmente mit ihrer Masse, den dazugehörigen sekundären Fragment-Ionen.

Fragment	Masse [Da]	Ionen-Typ	m/z
$p_2$	2132,993	a5	472,222
		x8	1016,908
		x13	1386,635
		x14	1518,675
$p_2^*$	1658,77	b16	1659,708
		y17	1731,823
		z3	329,231

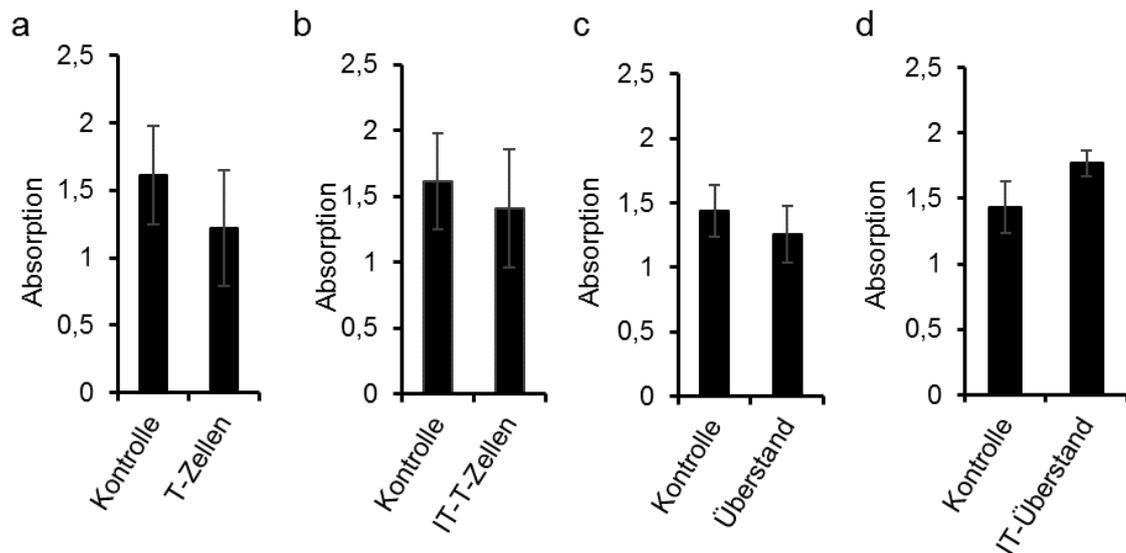
Die Ergebnisse der Massenspektrometrie wurden mit den *in silico* berechneten Massen der zu erwartenden Fragmente abgeglichen. Sowohl das Fragment  $p_2^*$ , als auch das Fragment  $p_2$  konnte detektiert werden. Mittels MS/MS-Scan konnten die Ionen-Typen der Peptid-Fragmente nachgewiesen werden und die Fragmente damit bestätigt werden (Tabelle 22). Ein vollständiger Satz an Ionen konnte weder für das Fragment  $p_2$  noch für  $p_2^*$  nachgewiesen werden. Da der massenspektrometrischen Analyse aber eine Aufreinigung des Zielproteins mittels SDS-PAGE vorausging, wurde davon ausgegangen, dass das Ergebnis spezifisch ist. Das gleichzeitige Vorliegen der Fragmente  $p_2$  und  $p_2^*$  im Lysat von HEK293-Zellen zeigt, dass das Immuntoxin VEGF-PE38D sowohl mit als auch ohne das ER-Signalpeptid SP(v) vorlag. Der Nachweis von prozessiertem VEGF-PE38D und unprozessiertem VEGF-PE38D in HEK293-Zellen lässt vermuten, dass der Transport des Immuntoxins in das ER nur bei einem Teil des rekombinanten Proteins stattfand, der andere Teil verblieb im Zytosol.

## 4.2.5 Zytotoxizität von Immuntoxin exprimierenden T-Zellen

### 4.2.5.1 Zytotoxischer Effekt von VEGF-PE38 sekretierenden T-Zellen auf HUVEC-Zellen

Die Expression der vollständigen, funktionalen, mRNA-kodierten Immuntoxine VEGF-PE38 und e23-PE38 in T-Zellen konnte gezeigt werden. Im Folgenden sollte *in vitro* untersucht werden, ob die zytotoxischen Eigenschaften der T-Zellen gegenüber Krebszellen durch die Expression des zytotoxischen Immuntoxins verstärkt werden.

Für T-Zellen, die mit VEGF-PE38-mRNA transfiziert waren, konnte gezeigt werden, dass sie das vollständige Immuntoxin VEGF-PE38 exprimierten und sekretieren (Abbildung 29). Das Immuntoxin VEGF-PE38 ist gegen den VEGF-Rezeptor gerichtet, der zum Beispiel auf der Zelloberfläche von HUVEC-Zellen präsentiert wird. Aufgrund der hohen Toxizität gegenüber den T-Zellen wurde angenommen, dass das Immuntoxin spezifisch, über die Hemmung des Elongationsfaktor-2, wirkt (Abbildung 22). Um die Toxizität des Immuntoxins VEGF-PE38 gegenüber VEGF-Rezeptor-positiven Zielzellen *in vitro* zu untersuchen, wurde die Wirkung von Immuntoxin sekretierenden T-Zellen gegenüber HUVEC-Zellen getestet. Für den *in vitro*-Toxizitäts-Assay wurden T-Zellen vier Tage nach der Aktivierung mit VEGF-PE38-mRNA transfiziert. 4 h nach der Transfektion wurden  $8 \times 10^4$  T-Zellen auf eine ÜN-Kultur von  $2 \times 10^4$  HUVEC-Zellen gegeben. Dabei wurden die T-Zellen in einem Effektor : Target-Verhältnis von 4 : 1 eingesetzt. Nach 24 h wurde die Vitalität der HUVEC-Zellen mittels WST-1-Assay ermittelt. Die Aktivität der T-Zellen wurde berücksichtigt indem diese, mit VEGF-PE38-mRNA transfiziert oder nicht transfiziert, in der in der Kokultur verwendeten Konzentration kultiviert wurden und der Wert der Absorption jeweils von dem der Kokultur abgezogen wurde. Zum Vergleich wurde der Effekt von nicht transfizierten T-Zellen untersucht. Für die T-Zellen, die mit MACSiBead™ Partikeln aktiviert worden waren, konnte eine unspezifische zytotoxische Aktivität gegenüber den HUVEC-Zellen beobachtet werden. Da diese zytotoxische Aktivität der T-Zellen die zytotoxische Aktivität des Immuntoxins überlagern kann, wurde der Versuch ebenfalls mit dem zellfreien Kulturüberstand der Immuntoxin sekretierenden T-Zell-Kulturen durchgeführt. Dazu wurden T-Zellen wie oben beschrieben transfiziert und kultiviert, der Kulturüberstand 24 h nach der Transfektion zellfrei entnommen und damit das Medium der HUVEC-Zellkultur ersetzt. Als Kontrolle wurde der Überstand von nicht transfizierten T-Zellen untersucht. Nach einer Inkubation von 24 h wurde die Vitalität der HUVEC-Zellen mittels WST-1-Assay ermittelt.



**Abbildung 32: Zytotoxischer Effekt von VEGF-PE38 exprimierenden T-Zellen bzw. deren Kulturüberstand auf HUVEC-Zellen. (a, b)** Vitalität von HUVEC-Zellen nach 24 h Kokultivierung mit T-Zellen **(a)** und VEGF-PE38-sekretierenden T-Zellen **(b)** im Effektor : Target-Verhältnis von 4 : 1. **(c, d)** Vitalität von HUVEC-Zellen nach Kultivierung für 24 h in zellfreiem Kulturüberstand von T-Zellen oder von VEGF-PE38-sekretierenden T-Zellen **(d)**. **(a - d)** Die Vitalität wurde jeweils im WST-1-Assay analysiert und gegen die Kontrolle, eine HUVEC-Kultur, aufgetragen. Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  s.d. von drei unabhängigen Experimenten, durchgeführt in Triplikaten.

Die Kultivierung von HUVEC-Zellen mit T-Zellen führte zu einer Reduktion der Vitalität der HUVEC-Zellen um  $25,4 \pm 9,8$  % (Abbildung 32 a). Im Unterschied dazu führte die Kultivierung von VEGF-PE38-sekretierenden T-Zellen mit HUVEC-Zellen nur zu einer Reduktion der Vitalität der HUVEC-Zellen um  $12,8 \pm 7,2$  % (Abbildung 32 b). Der WST-1-Assay zeigt demnach, dass T-Zellen eine unspezifische zytotoxische Wirkung gegenüber den HUVEC-Zellen ausübten. Diese zytotoxische Wirkung war bei den Immuntoxin sekretierenden T-Zellen wieder aufgehoben; vermutlich beeinträchtigt die Wirkung des Immuntoxins auf die T-Zellen deren zytotoxische Aktivität gegenüber den Krebszellen. Deshalb ließ sich eine mögliche toxische Wirkung des durch die T-Zellen sekretierten Immuntoxins VEGF-PE38 auf die HUVEC-Zellen mittels WST-1-Assay nicht nachweisen; ein möglicher Effekt könnte durch den verminderten Effekt der T-Zellen überdeckt worden sein. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass T-Zellen, die ein Immuntoxin exprimieren, kaum proliferieren (Abbildung 26 b). Danach lagen zum Zeitpunkt der Messung, nach 24 h, vermutlich circa 60 % weniger T-Zellen in dem Ansatz mit transfizierten T-Zellen vor, als in dem Kontrollansatz mit nicht transfizierten T-Zellen. Die um 60 % reduzierte Zellzahl würde die um knapp 50 % reduzierte zytotoxische Wirkung der T-Zellen erklären. Da die Proliferation der T-Zellen in einer Monokultur und nicht in der Kokultur untersucht wurde, kann dieser Vergleich aber nicht endgültig gezogen werden und die Werte in Abbildung 32 a und Abbildung 32 b können aufgrund der unterschiedlichen

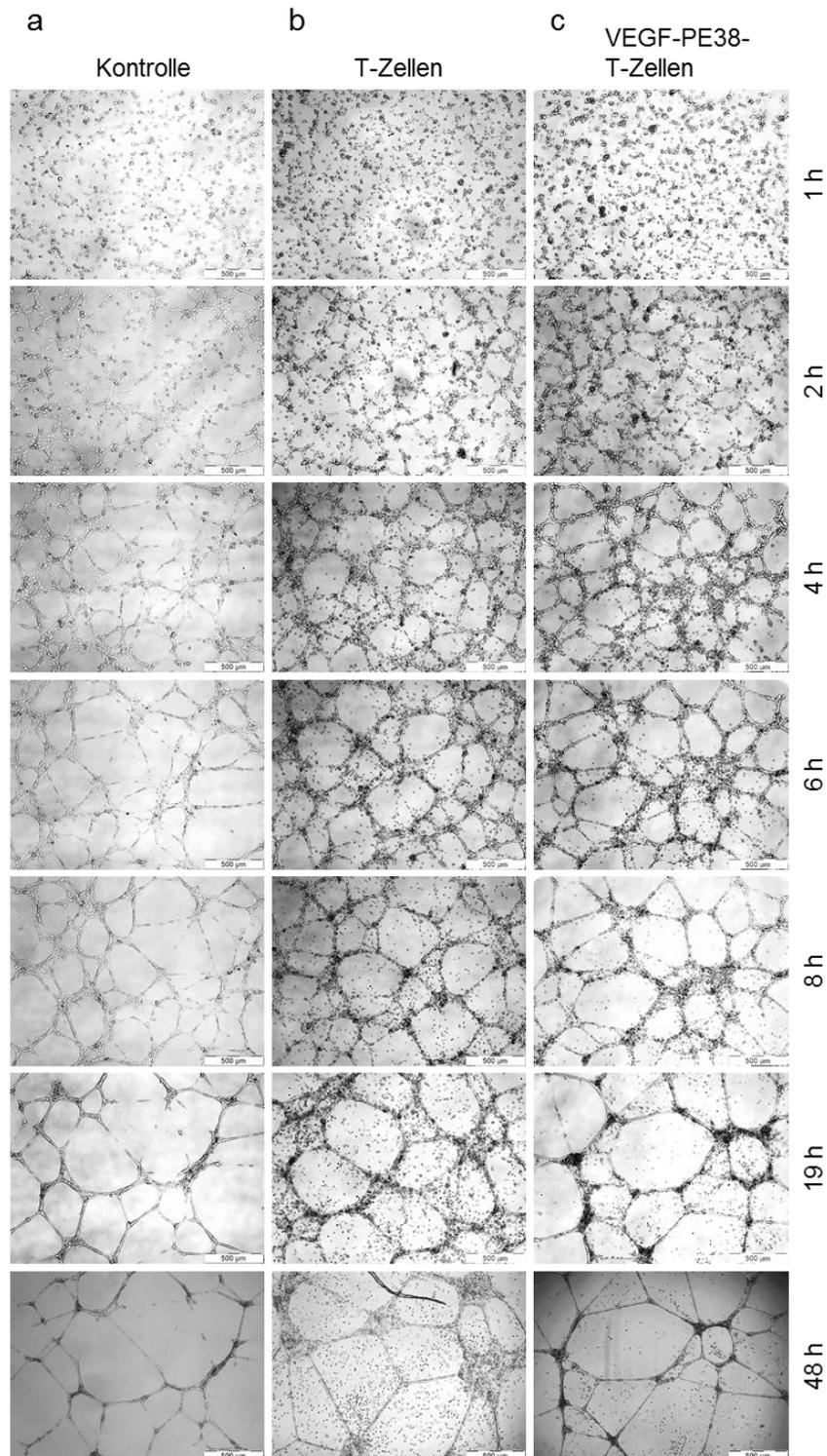
Proliferationsraten nicht direkt miteinander verglichen werden. Eine verminderte Vitalität der T-Zellen wird vermutlich mit einer verminderten Aktivität im Allgemeinen und einer verminderten Zytotoxizität im Speziellen, eventuell auch mit einer verminderten Sekretion des Immuntoxins einhergehen. Diese kann ebenso die zytotoxische Aktivität der T-Zellen beeinträchtigt haben. Um den Effekt des durch die T-Zellen sekretierten Immuntoxins unabhängig von möglichen Effekten der T-Zellen zu untersuchen, wurden die HUVEC-Zellen im Überstand von transfizierten T-Zellen kultiviert. Die Kultivierung von HUVEC-Zellen in zellfreiem Kulturüberstand von T-Zellen führte zu einer Reduktion der Vitalität der HUVEC-Zellen auf  $84,4 \pm 4,5$  % (Abbildung 32 c). Eine Kultivierung von HUVEC-Zellen in zellfreiem Kulturüberstand von Immuntoxin sekretierenden T-Zellen führte im Unterschied dazu zu einer auf  $110,9 \pm 17,5$  % erhöhten Vitalität, die allerdings aufgrund der hohen Standardabweichung nicht signifikant war. Die Verminderung der Vitalität der in mit Kulturüberstand von T-Zellen kultivierten HUVEC-Zellen ist eventuell auf eine Reduktion der Nährstoffe im Medium zurückzuführen. Proliferierende T-Zellen haben einen erhöhten Nährstoffbedarf und da die Immuntoxin exprimierenden T-Zellen kaum proliferieren, waren mehr Nährstoffe im Kulturüberstand verblieben. Eine Wirkung des Immuntoxins VEGF-PE38 auf VEGF-Rezeptor-positive HUVEC-Zellen war folglich auch nicht mit dem Überstand der T-Zellkulturen nachzuweisen. Ein Grund hierfür könnte unter anderem die geringe Stabilität des Immuntoxins im Kulturmedium sein, so dass eine effektive Konzentration nicht über einen ausreichend langen Zeitraum aufrecht erhalten werden konnte. Da das Immuntoxin durch das VEGF hoch spezifisch für die HUVEC-Zellen ist, sollte eine geringe Menge an Immuntoxin ausreichen. In *in vitro*-Versuchen konnten hMSCs-ähnliche Zellen erfolgreich als Vektor für das Delivery von Plasmid-kodiertem VEGF-PE38 Immuntoxin genutzt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die hMSCs-ähnlichen Zellen das Immuntoxin sekretieren und mit dem Überstand konnten HUVEC-Zellen selektiv getötet werden. Die effektive Dosis des durch  $1 \times 10^4$  hMSCs-ähnliche Zellen über einen Zeitraum von 48 h sekretierten Immuntoxins für  $1 \times 10^4$  HUVEC-Zellen wurde mit circa 1,4 ng bestimmt (Hu *et al.*, 2009). Für den oben beschriebenen Versuch würde das einer effektiven Dosis von 3 ng Immuntoxin entsprechen. Da jedoch das Immuntoxin im ELISA nicht quantifiziert werden konnte, konnte auch nicht abgeschätzt werden, ob genügend Immuntoxin sekretiert wurde.

#### 4.2.5.2 VEGF-PE38 exprimierende T-Zellen im Tube-Formation-Assay

Beim Tube-Formation-Assay werden HUVEC-Zellen dazu angeregt, auf einer extrazellulären Matrix kapillarähnliche Strukturen, auch Tubes genannt, auszubilden. Diese Form der Angiogenese bildet eine wichtige Rolle bei der Ausbildung der Neovaskulatur, die

den Tumor durchzieht und ist deshalb Ziel vieler Tumorthérapien. Für *in vitro*-Versuche werden HUVEC-Zellen genutzt, die VEGFR-1 und VEGFR-2 exprimieren und auf der Zelloberfläche präsentieren, um Modelle eines neurovaskulären Systems zu erstellen (Aparicio *et al.*, 2005). Der Tube-Formation-Assay ist eine sensitive Methode um die Auswirkung von Toxinen gegen HUVEC-Zellen zu untersuchen, da schon geringe Mengen Wirkstoff eine Änderung in der Morphologie bewirken können. In der vorliegenden Arbeit wurden die Eigenschaft von HUVEC-Zellen, *in vitro* blutgefäßähnliche Strukturen auszubilden genutzt, um die Wirkung des Immuntoxins VEGF-PE38 auf VEGFR-2-positive HUVEC-Zellen zu analysieren.

Um den Effekt der Sekretion des Immuntoxins VEGF-PE38 im Tube-Formation-Assay zu untersuchen, wurden T-Zellen vier Tage nach der Aktivierung mit 25 µg VEGF-PE38-mRNA transfiziert. Nach einer Inkubation von 4 h wurden die VEGF-PE38-exprimierenden T-Zellen gemeinsam mit in 100 µl EGCM gelösten HUVEC-Zellen in den mit Matrigel gefüllten µ-slides ausgesät. T-Zellen und HUVEC-Zellen wurden dabei in einem Effektor : Target-Verhältnis von 4 : 1 eingesetzt. Der Versuch wurde ebenfalls mit nicht transfizierten T-Zellen durchgeführt, als Kontrolle diente ein Ansatz mit HUVEC-Zellen, die ohne T-Zellen kultiviert wurden. Die Ausbildung von Tube-ähnlichen Strukturen wurde über einen Zeitraum von 48 h mittels Durchlicht-Mikroskopie dokumentiert. Eine Calcein-Färbung wurde nach einer Inkubation von 48 h durchgeführt und mittels Fluoreszenzmikroskopie dokumentiert. Die Ausschnitte zeigen den Mittelteil eines Wells des µ-slides, der ca 50 % der Fläche eines Wells entspricht.

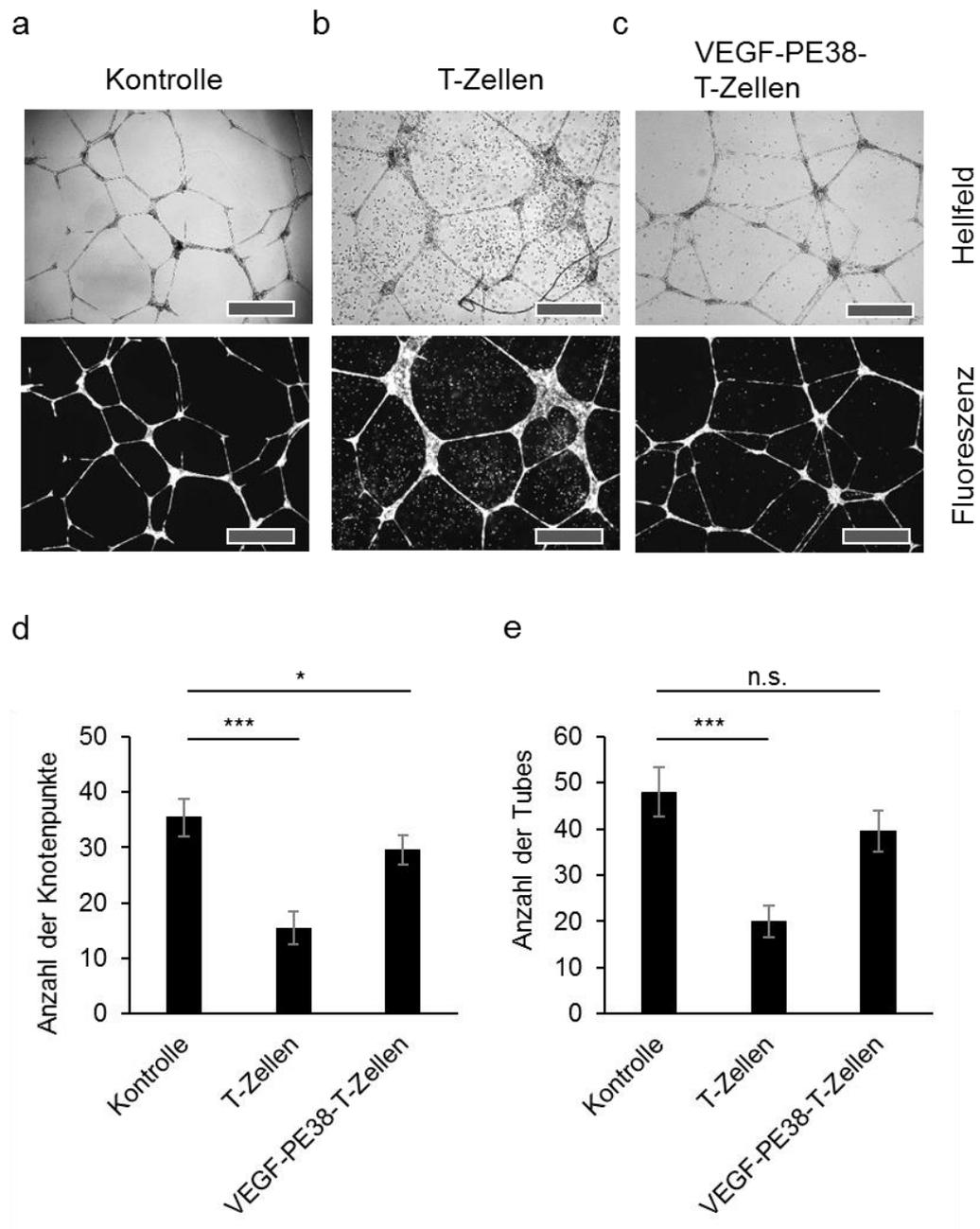


**Abbildung 33: Effekt von VEGF-PE38 sekretierenden T-Zellen auf HUVEC-Zellen im Tube-Formation-Assay.**  $2 \times 10^4$  HUVEC-Zellen wurden auf Matrigel im Tube-Formation-Assay für 48 h kultiviert. **(a)** Kontrolle mit Zellkulturmedium. **(b)** Kokultivierung mit  $8 \times 10^4$  T-Zellen. **(c)** Kokultivierung mit  $8 \times 10^4$  VEGF-PE38-sekretierenden T-Zellen. **(a - c)** Die Ausbildung von Tubes wurde im Lichtmikroskop dokumentiert. Objektiv 4x. Maßstab: 500 µm.

Für auf Matrigel kultivierten HUVEC-Zellen konnte gezeigt werden, dass sie innerhalb von 24 h pseudovaskuläre Netzwerke ausbilden (Abbildung 33 a). HUVEC-Zellen in

einem Effektor : Target-Verhältnis von 4 : 1 mit aktivierten T-Zellen bildeten im Tube-Formation-Assay ebenfalls über einen Zeitraum von 24 h ein pseudovaskuläres Netzwerk aus, allerdings wurden bei diesem Ansatz deutlich größere Knotenpunkte durch die HUVEC-Zellen gebildet (Abbildung 33 b). Das ging einher mit insgesamt weniger Knotenpunkten und weniger Tubes pro analysiertem Ausschnitt. Wurde der Tube-Formation-Assay mit der gleichen Menge VEGF-PE38-sekretierenden T-Zellen durchgeführt, so bildeten die HUVEC-Zellen pseudovaskuläre Netzwerke aus, die mit denen der reinen HUVEC-Kultur vergleichbar waren (Abbildung 33 c). Es wurde hiermit ein deutlicher Effekt der nicht transfizierten T-Zellen auf die HUVEC-Zellen beobachtet, welcher durch die Transfektion der T-Zellen mit VEGF-PE38-mRNA wieder aufgehoben wurde. Dieses Ergebnis ähnelt dem Ergebnis des WST-1-Assays, bei dem ein Effekt der T-Zellen auf die Vitalität der HUVEC-Zellen zu beobachten war, der bei Immuntoxin sekretierenden T-Zellen teilweise wieder aufgehoben wurde.

Um die Vitalität sowohl der HUVEC-Zellen, als auch der T-Zellen zu überprüfen, wurde nach 48 h Kokultivierung eine Lebendzellfärbung mit Calcein durchgeführt und im Fluoreszenzmikroskop dokumentiert. Um den Einfluss der T-Zellen auf die Angiogenese genauer zu analysieren, wurden die Anzahl der Tubes und die Anzahl der Knotenpunkte im Hellfeld ausgezählt. Die Analyse des pseudovaskulären Netzwerkes wurde mit der Software Angiogenesis Analyzer for ImageJ durchgeführt (Carpentier, 2012).



**Abbildung 34: Einfluss von VEGF-PE38 exprimierenden T-Zellen auf die Anzahl von Knotenpunkten und Tubes im Tube-Formation-Assay.**  $2 \times 10^4$  HUVEC-Zellen wurden auf Matrigel im Tube-Formation-Assay für 48 h kultiviert. **(a - c)** Nach einer Inkubation von 48 h wurde eine Calcein-Färbung durchgeführt und im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Objektiv 4x. Maßstab: 500 µm. **(d)** Anzahl der Knotenpunkte der pseudovaskulären Netzwerke nach 48 h. **(e)** Anzahl der Tubes der pseudovaskulären Netzwerke nach 48 h. **(d, e)** Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  s.d. von fünf Experimenten. Sternchen repräsentieren die statistische Signifikanz ( $p \leq 0,05$ : \*,  $p \leq 0,005$ : \*\*\*).

Mittels Calceinfärbung der Zellen in den Tube-Formation-Assays konnte für alle drei Ansätze gezeigt werden, dass die HUVEC-Zellen und die T-Zellen vital waren (Abbildung 34 a - c). Das Calcein-Signal der kapillarförmigen Strukturen in der Kontrolle und im Ansatz mit den VEGF-PE38-sekretierenden T-Zellen war deutlich stärker als das des Ansatzes mit

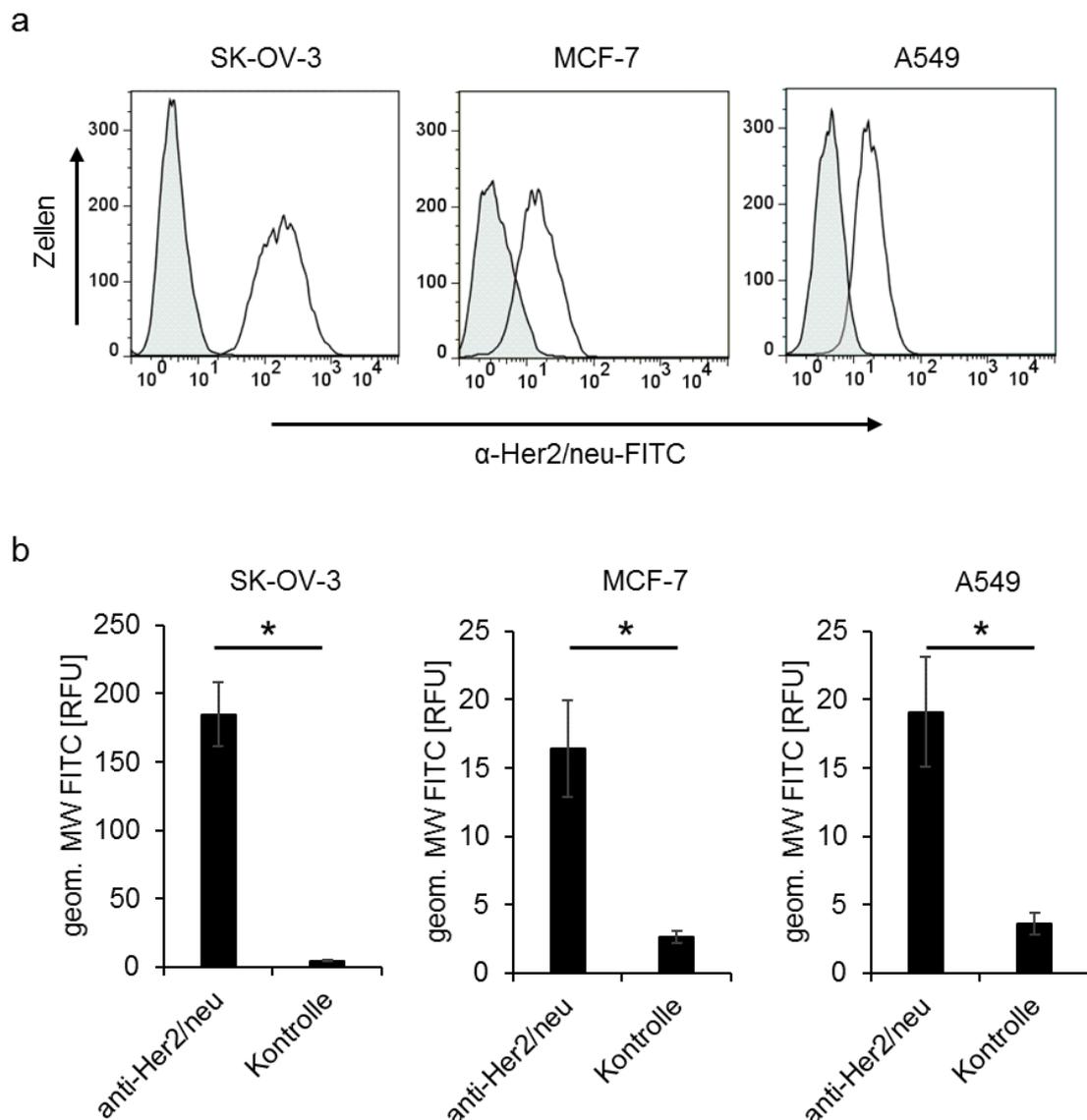
nicht transfizierten T-Zellen. Dies kann entweder auf eine höhere Vitalität der HUVEC-Zellen zurückzuführen sein, aber ebenso auf eine höhere Dichte. Die in den Mikroskopieaufnahmen zu erkennenden T-Zellen waren in das Matrigel eingewandert und auch durch mehrmaliges Waschen nicht zu entfernen. Die Bestimmung der Anzahl der Knotenpunkte der Tubes ergab eine deutliche Reduktion bei den mit nicht transfizierten T-Zellen kultivierten HUVECS gegenüber der Kontrolle (Abbildung 34 d). Gleiches galt für die Anzahl der Tubes (Abbildung 34 e). Die Kokultivierung mit VEGF-PE38-sekretierenden T-Zellen führte nur zu einer geringen Reduktion der Anzahl der Knotenpunkte und einer nicht signifikanten Reduktion der Anzahl der Tubes gegenüber der Kontrolle (Abbildung 34 d, e). Wie bei der Analyse der Vitalität war ein Einfluss der T-Zellen auf die Zielzellen zu messen, der durch die Expression des Immuntoxins durch die T-Zellen ganz oder teilweise wieder aufgehoben wurde.

Die mögliche Auswirkung von PE38 auf die Bildung der pseudovaskulären Netzwerke der HUVEC-Zellen sollte untersucht werden, indem der Effekt von PEA im Tube-Formation-Assay getestet wurde. Dazu wurden  $2 \times 10^4$  HUVEC-Zellen auf Matrigel in  $\mu$ -slides ausgesät und nach 4 h das Zellkulturmedium durch Medium ersetzt, dem PEA in den Konzentrationen 5  $\mu$ g/ml, 500 ng/ml, 50 ng/ml und 5 ng/ml zugesetzt war. Mittels lichtmikroskopischer Analyse der Ausbildung von pseudovaskulären Netzwerken durch HUVEC-Zellen konnte nach 24 h im Tube-Formation-Assay erst ab einer Konzentration von 5  $\mu$ g/ml PEA eine toxische Wirkung beobachtet werden. Die pseudovaskulären Netzwerke zeigten verkürzte kapillarähnliche Strukturen und kleinere Knotenpunkte als bei der Kontrolle (Daten nicht gezeigt).

#### **4.2.5.3 Zytotoxischer Effekt von e23-PE38 exprimierenden T-Zellen gegenüber SK-OV-3-Zellen**

Es konnte gezeigt werden, dass rekombinantes, mRNA-kodiertes eGFP, dem das Signalpeptid von IFN $\gamma$  vorangestellt war, in das ER von T-Zellen transportiert wurde (Abbildung 13). Damit das Immuntoxin e23-PE38 in das ER transportiert werden konnte, wurde diesem ebenfalls das Signalpeptid von IFN $\gamma$  vorangestellt. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Möglichkeit der Kombination einer bsAk HEA125xOKT3 vermittelten adaptiven T-Zell-Therapie mit einer Therapie mit durch T-Zellen synthetisiertem, rekombinantem Immuntoxin zu untersuchen. Um die kombinierte Wirkung des gegen den Tumormarker EpCAM gerichteten bsAk HEA125xOKT3 und des gegen den epidermalen Wachstumsrezeptor Her2/neu gerichteten Immuntoxins e23-PE38 zu ermitteln, mussten Zielzellen gewählt werden, die sowohl EpCAM-positiv, als auch Her2/neu-positiv sind. Für

die Ovarkrebszelllinie SK-OV-3, die Brustkrebszelllinie MCF-7 und die Adenokarzinomzelllinie A549 konnte mittels Antikörperfärbung in der Durchflusszytometrie gezeigt werden, dass diese EpCAM-positiv waren (interne Information). Für die Zelllinie SK-OV-3 wurden in der Literatur eine hohe, für die Zelllinie A549 eine niedrige Menge von auf der Zelloberfläche präsentem Her2/neu beschrieben (Liu *et al.*, 2014). Die Menge des Zielproteins auf der Oberfläche der Zielzellen ist entscheidend für die Effizienz der Bindung des Immuntoxins im *in vitro*-Toxizitäts-Assay. In einer anderen Studie konnte mittels Whole-cell-ELISA gezeigt werden, dass das e23-basierte, in *E. coli* exprimierte Immuntoxin e23-L-rGel mit deutlich höherer Effizienz an SK-OV-3-Zellen als an MCF-7-Zellen bindet. Dies resultierte in einer deutlich erhöhten Toxizität des Immuntoxins und einer um den Faktor 16 reduzierten IC<sub>50</sub> (Cao *et al.*, 2009). Für die Zelllinie MCF-7 wurde nur eine geringe Menge von auf der Zelloberfläche präsentem Her2/neu beschrieben, weshalb diese Zelllinie häufig als Negativkontrolle eingesetzt wird. Um eine optimale Zielzelle für den geplanten Versuch zu finden, wurde für diese drei Zelllinien die Präsentation von Her2/neu-Rezeptoren auf der Zelloberfläche quantitativ ermittelt. Dafür wurden subkonfluente Zellkulturen der drei Zelllinien geerntet, eine Immunfärbung mit dem anti-Her2/neu-Antikörper durchgeführt und das Fluoreszenzsignal der Immunofärbung mittels Durchflusszytometrie quantifiziert.



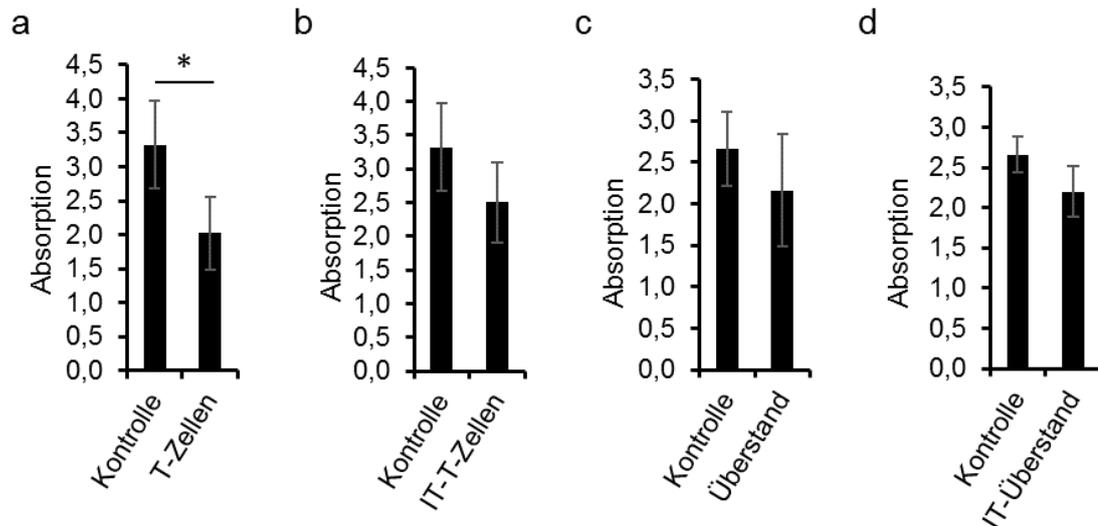
**Abbildung 35: Präsentation von Her2/neu auf SK-OV-3-Zellen, MCF-7-Zellen und A549-Zellen.** Immunologischer Nachweis von Her2/neu auf SK-OV-3-, MCF-7- und A549-Zellen mittels Durchflusszytometrie. **(a)** Exemplarische Histogramme der Färbungen mit dem anti-Her2/neu-Antikörper. **(b)** Geometrischer Mittelwert des FITC-Signals bei SK-OV-3-, MCF-7- und A549-Zellen. Als Kontrolle wurden jeweils nicht gefärbte Zellen verwendet. Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  s.d. von zwei unabhängigen Experimenten, durchgeführt in Duplikaten. Sternchen repräsentieren die statistische Signifikanz ( $p \leq 0,05$ : \*).

Die mit dem anti-Her2/neu-Antikörper gefärbten SK-OV-3-Zellen waren deutlich von den nicht gefärbten Zellen abzugrenzen. Dies konnte weder für MCF-7-Zellen noch für A549-Zellen gezeigt werden (Abbildung 35 a). Der geometrische Mittelwert der Fluoreszenz erhöhte sich jeweils nur um den Faktor sechs. Der geometrische Mittelwert der mit anti-Her2/neu-Antikörper gefärbten SK-OV-3-Zellen erhöhte sich dagegen um den Faktor 40 auf einen Wert von  $187,5 \pm 19$  RFU, wodurch gezeigt werden konnte, dass die SK-OV-3-Zellen

sich als Zielzellen für eine HEA125xOKT3-vermittelte T-Zell-Therapie mit einem e23-basierten Immuntoxin eignen (Abbildung 35 b).

Mittels Western-Analyse konnte gezeigt werden, dass das Immuntoxin VEGF-PE38 durch T-Zellen vollständig exprimiert wurde (Abbildung 21) und aufgrund der hohen Toxizität gegenüber den T-Zellen wurde angenommen, dass das Immuntoxin spezifisch, also über die Hemmung des Elongationsfaktor-2 wirkt (Abbildung 22). Ausgehend von der Annahme, dass die transient transfizierten T-Zellen ein intaktes, hoch toxisches Immuntoxin exprimierten, sollte die Wirkung des Immuntoxins e23-PE38 im Folgenden in einem *in vitro*-Toxizitäts-Assay gegenüber SK-OV-3-Zellen untersucht werden.

Da das Immuntoxin e23-PE38 spezifisch an das auf der Zelloberfläche von SK-OV-3-Zellen präsente Her2/neu bindet, kann von einem hochspezifischen Targeting ausgegangen werden. Die maximale Menge an mRNA wurde gewählt, weil die Wirkung des Immuntoxins gegenüber dem T-Zell-Effekt herausgearbeitet werden sollte und für T-Zellen, die mit 15 µg mRNA transfiziert waren, trotz stark verminderter Vitalität noch eine maximale Synthese von Immuntoxin gezeigt werden konnte (Abbildung 21). Für den *in vitro*-Toxizitäts-Assay wurden T-Zellen vier Tage nach der Aktivierung mit 25 µg SP(i)-e23-PE38-mRNA transfiziert.  $2 \times 10^4$  SK-OV-3-Zellen wurden in 96-well-Platten ausgesät und ÜN inkubiert. 4 h nach der Transfektion wurden  $8 \times 10^4$  T-Zellen in einem Effektor : Target-Verhältnis von 4 : 1 zu den SK-OV-3-Monolayern gegeben. Nach einer Koinkubation von 24 h wurde die Vitalität der SK-OV-3-Zellen mittels WST-1-Assay analysiert. Dabei wurde die Aktivität der transfizierten bzw. nicht transfizierten T-Zellen berücksichtigt, indem ihre in einer Monokultur bestimmte Aktivität von der Aktivität der Kokulturen abgezogen wurde. Um die zytotoxische Aktivität des Immuntoxins ohne den Einfluss einer unspezifischen zytotoxischen Aktivität der T-Zellen zu analysieren, wurde die Wirkung des Überstands von e23-PE38-sekretierenden T-Zellen auf SK-OV-3-Monolayern untersucht. Dazu wurden T-Zellen an Tag vier nach der Aktivierung mit 25 µg SP(i)-e23-PE38-mRNA transfiziert und nach einer Inkubation von 24 h wurde der Kulturüberstand zellfrei geerntet. Der Überstand der SK-OV-3-Zellkultur wurde gegen den T-Zell-Überstand ausgetauscht und die Vitalität der Krebszellen wurde nach einer Inkubation von 24 h mittels WST-1-Assay analysiert.



**Abbildung 36: Zytotoxischer Effekt von e23-PE38 exprimierenden T-Zellen bzw. deren Kulturüberstand auf SK-OV-3-Zellen. (a, b) Vitalität von SK-OV-3-Zellen nach 24 h Kokultivierung mit T-Zellen oder e23-PE38-exprimierenden T-Zellen (b) im Effektor : Target-Verhältnis von 4 : 1. (c, d) Vitalität von SK-OV-3-Zellen nach 24 h Kultivierung in zellfreiem Kulturüberstand von T-Zellen (c) oder von e23-PE38-exprimierenden T-Zellen (d). (a - d) Die Vitalität wurde jeweils im WST-1-Assay analysiert, als Referenz wurde eine SK-OV-3-Kultur analysiert. Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  s.d. von drei unabhängigen Experimenten, durchgeführt in Triplikaten. Sternchen repräsentieren die statistische Signifikanz ( $p \leq 0,05$ : \*).**

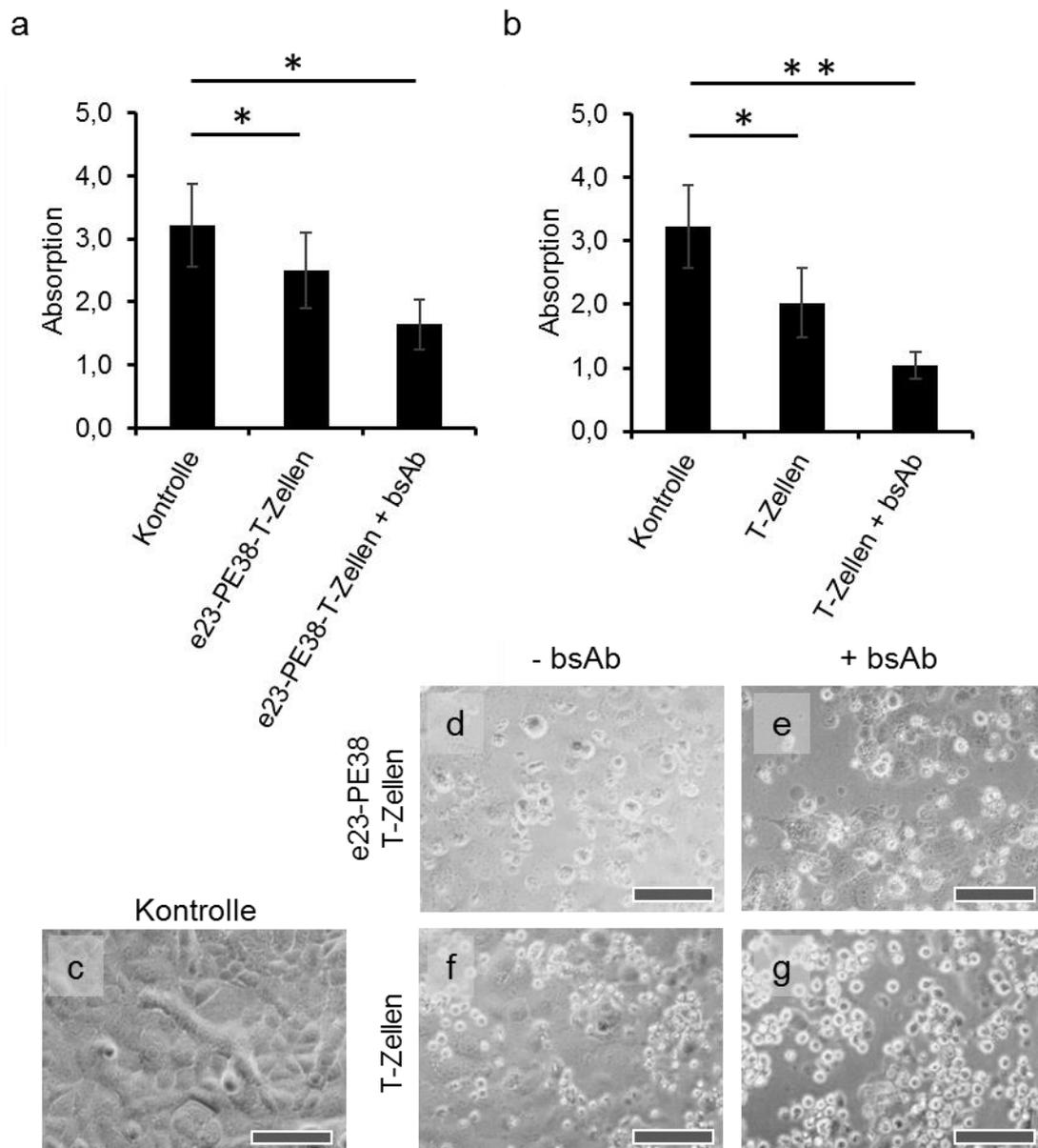
Die Kokultivierung von SK-OV-3-Zellen mit T-Zellen führte zu einer Reduktion der Vitalität der SK-OV-3-Zellen auf  $63,8 \pm 8,4 \%$ , die auf eine unspezifische zytotoxische Aktivität der T-Zellen zurückzuführen war (Abbildung 36 a). Wurden T-Zellen verwendet, die das Immuntoxin e23-PE38 sekretierten, so konnte auch eine Reduktion der Vitalität der SK-OV-3-Zellen beobachtet werden, allerdings fiel diese mit  $78,4 \pm 6,5 \%$  geringer aus (Abbildung 36 b). Ein zusätzlicher zytotoxischer Effekt durch das Immuntoxin konnte folglich in diesem Versuch nicht beobachtet werden. Wie bei der Wirkung von VEGF-PE38-sekretierenden T-Zellen auf HUVEC-Zellen war die unspezifische Aktivität der e23-PE38-sekretierenden T-Zellen auf die SK-OV-3-Zellen im Vergleich zu nicht transfizierten T-Zellen reduziert (Abbildung 31). Es konnte gezeigt werden, dass die e23-PE38-Expression eine verminderte Proliferation der T-Zellen bewirkt (Abbildung 26 b). Berücksichtigt man diese unterschiedlichen Proliferationsraten, so ist davon auszugehen, dass zum Zeitpunkt der WST-1-Assay halb so viele e23-PE38-exprimierende T-Zellen im *in vitro*-Toxizitäts-Assay vorlagen, wie nicht transfizierte T-Zellen. Weniger T-Zellen führten zu einer verminderten toxischen Wirkung auf die Zielzellen. Aus diesem Grund sind die Werte der mittels WST-1-Assay bestimmten Vitalität in Abbildung 36 a und 37 b auch nicht direkt miteinander vergleichbar. Die Kultivierung von SK-OV-3-Zellen im Überstand von nicht transfizierten T-Zellen führte zu einer Verminderung der Vitalität der Krebszellen auf  $75,2 \pm 7,1 \%$  (Abbildung 36 c). Der Überstand von T-Zellen, die e23-PE38 sekretieren, führte dagegen

zu einer nicht signifikanten Verminderung der Vitalität der SK-OV-3-Zellen auf  $91 \pm 8,2\%$  (Abbildung 36 d). Diese Reduktion der Vitalität könnte auf die Qualität des Kulturüberstandes zurückzuführen sein. Das Medium der nicht transfizierten, proliferierenden T-Zellen war stärker verbraucht als Medium der nicht proliferierenden, Immuntoxin exprimierenden T-Zellen. Ein Effekt des Immuntoxins auf die Vitalität der SK-OV-3-Zellen ließ sich in diesem Versuch ebenfalls nicht nachweisen, da schon das Immuntoxin-freie Medium eine die Vitalität vermindernde Wirkung auf die SK-OV-3-Zellen zeigte.

#### **4.2.5.4 HEA125xOKT3 vermittelte Toxizität von e23-PE38 exprimierenden T-Zellen gegenüber SK-OV-3 Zellen**

Für T-Zellen, die mit SP(i)-e23-PE38-mRNA transfiziert wurden, konnte gezeigt werden, dass sie das Immuntoxin e23-PE38 exprimieren (Abbildung 21), allerdings konnte in einer Kokultur von e23-PE38 sekretierenden T-Zellen und SK-OV-3-Zellen keine toxische Wirkung des Immuntoxins gegenüber den T-Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 36). Der bsAk HEA125xOKT3 koppelt die CD3-positiven T-Zellen an die EpCAM-positiven SK-OV-3-Zellen. Für die Immuntoxin sekretierenden T-Zellen würde das bedeuten, dass das Immuntoxin in unmittelbarer Nähe der Zielzelle ausgeschüttet wird, was die effektive Dosis des Toxins erhöht. Deshalb sollte untersucht werden, ob bei Verwendung des bsAk HEA125xOKT3 mit Immuntoxin sekretierenden T-Zellen eine Wirkung des Immuntoxins e23-PE38 gegenüber SK-OV-3-Zellen nachgewiesen werden kann.

Dafür wurden T-Zellen an Tag vier nach der Aktivierung mit SP(i)-e23-PE38-mRNA transfiziert. 4 h nach der Transfektion wurden  $8 \times 10^4$  T-Zellen auf eine ÜN-Kultur von  $2 \times 10^4$  SK-OV-3-Zellen gegeben. Dies entsprach einem Effektor : Target-Verhältnis von 4 : 1. Der bsAk HEA125xOKT3 wurde in einer Konzentration von  $0,1 \mu\text{g/ml}$  eingesetzt. Strauß *et al.* (1999) setzten den bsAk HEA125xOKT3 in einem T-Zell-Assay mit einer Konzentration von  $1 \mu\text{g/ml}$  ein, zeigten aber auch, dass der Einsatz von  $0,1 \mu\text{g/ml}$  nur zu einer Reduktion der spezifischen Lyse um circa 10 % auf circa 40 % der Kontrolle führte. Der Einsatz des bsAk in einer Konzentration von  $0,1 \mu\text{g/ml}$  sollte noch effektiv sein, aber zu einem abgemilderten zytotoxischen Effekt führen, der es ermöglicht, einen zusätzlichen Effekt des Immuntoxins herauszuarbeiten. Der Versuch wurde zum Vergleich mit nicht transfizierten T-Zellen durchgeführt. Nach einer Inkubation von 24 h wurde die Vitalität der SK-OV-3-Zellen mittels WST-1-Assay bestimmt. Die Aktivität der jeweiligen T-Zell-Kulturen wurde, wie oben beschrieben, von der Aktivität der entsprechenden Kokulturen abgezogen.



**Abbildung 37: Einfluss der Expression von e23-PE38 auf den bsAk-vermittelten T-Zell-Effekt.** (a)  $5 \times 10^6$  T-Zellen wurden mit  $25 \mu\text{g}$  SP(i)-e23-PE38-mRNA transfiziert und T-Zellen wurden mit SK-OV-3 Zellen im Effektor : Target-Verhältnis von 4 : 1 mit oder ohne Zugabe von  $0,1 \mu\text{g/ml}$  HEA125xOKT3 kokultiviert, als Kontrolle diente eine SK-OV-3-Monokultur. (b)  $5 \times 10^6$  T-Zellen wurden mit SK-OV-3 Zellen im Effektor : Target-Verhältnis von 4 : 1 mit oder ohne Zugabe von  $0,1 \mu\text{g/ml}$  HEA125xOKT3 kultiviert, als Kontrolle diente eine SK-OV-3-Monokultur. (a, b) Vitalität der Zellen nach 24 h mittels WST-1-Assay bestimmt. Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  s.d. von drei unabhängigen Experimenten, durchgeführt in Triplikaten. Sternchen repräsentieren die statistische Signifikanz ( $p \leq 0,05$ : \*,  $p \leq 0,01$ : \*\*). (c - g) Mikroskopische Aufnahmen der SK-OV-3-Zellkulturen nach Inkubation für 48 h mit Medium (Kontrolle) (c), mit e23-PE38 sekretierenden T-Zellen (d), mit e23-PE38 sekretierenden T-Zellen und HEA125xOKT3 (e), mit T-Zellen (f), mit T-Zellen und HEA125xOKT3 (g). Maßstab:  $50 \mu\text{m}$ . [Abbildung modifiziert nach Eggers *et al.*, 2018]

Die unspezifische, zytotoxische Aktivität von e23-PE38-exprimierenden T-Zellen führte nach einer Inkubation von 24 h zu einer Reduktion der Vitalität der SK-OV-3-Zellen auf  $78,3 \pm 6,5 \%$  gegenüber der Kontrolle. Der bsAk-vermittelte T-Zell-Effekt von aktivierten

T-Zellen, die das Immuntoxin e23-PE38 exprimierten, führte nach 24 h zu einer zusätzlichen Reduktion der Vitalität der SK-OV-3-Zellen auf  $51,6 \pm 4,9$  % (Abbildung 37 a). Die Zugabe von nicht transfizierten T-Zellen führten innerhalb von 24 h zu einer unspezifischen Reduktion der Vitalität auf  $63,8 \pm 8,4$  % und die Zugabe von nicht transfizierten T-Zellen gemeinsam mit dem bsAk HEA125xOKT3 innerhalb von 24 h zu einer ebenfalls zusätzlichen Reduktion der Aktivität der SK-OV-3-Zellen auf  $24,6 \pm 2,2$  % gegenüber der Kontrolle (Abbildung 37 b). Dieser Effekt war ebenfalls unter dem Mikroskop zu erkennen. Der in der Kontrolle intakte Monolayer der SK-OV-3-Zellen (Abbildung 37 c) war durch Zugabe von T-Zellen angegriffen (Abbildung 37 d, f), bei zusätzlicher Gabe des bsAk HEA125xOKT3 war er fast vollständig zerstört (Abbildung 37 e, g). Vergleicht man die Immuntoxin exprimierenden T-Zellen (Abbildung 37 d, e) mit den nicht transfizierten T-Zellen (Abbildung 37 f, g), so sind bei Zugabe von nicht transfizierten T-Zellen jeweils weniger SK-OV-3-Zellen und mehr T-Zellen pro Bildausschnitt zu erkennen. Der zytotoxische Effekt sowohl von T-Zellen die e23-PE38 exprimierten und sekretierten, als auch von nicht transfizierten T-Zellen, konnte folglich durch Zugabe des bsAk HEA125xOKT3 erhöht werden. Die zytotoxische Wirkung von nicht transfizierten T-Zellen mit oder ohne Zugabe des bsAk war also größer als die der Immuntoxin exprimierenden T-Zellen. Eine Auszählung der T-Zellen ergab, dass die Zahl der T-Zellen, die das Immuntoxin exprimierten um einen Faktor von circa vier reduziert war. Das galt sowohl mit als auch ohne Zugabe des bsAk. Dieses Ergebnis stimmt überein mit der Analyse der Proliferation der Immuntoxin exprimierenden T-Zellen (Abbildung 26).

Zusammengefasst konnte die Expression zweier zytotoxisch aktiver Immuntoxine durch transient transfizierte T-Zellen gezeigt werden. Die Ergebnisse des *in vitro*-Toxizitäts-Assays zeigen, dass Immuntoxin synthetisierende T-Zellen grundsätzlich in der Lage waren, den T-Zell-Effekt auszuführen (Abbildung 37 a). Eine zusätzliche zytotoxische Wirkung der Immuntoxin sekretierenden T-Zellen gegenüber den entsprechenden Zielzellen konnte nicht nachgewiesen werden, allerdings auch nicht ausgeschlossen werden, da diese vermutlich durch die zytotoxische Wirkung der T-Zellen überdeckt wurde. Prinzipiell konnte aber gezeigt werden, dass mRNA-transfizierte, Immuntoxin exprimierende, primäre T-Zellen im Rahmen einer Krebstherapie eingesetzt werden können.

## 5 Diskussion

Beim Einsatz von Immuntherapien für die Behandlung von Tumoren werden Mechanismen des körpereigenen Immunsystems genutzt, um den Krebs zu bekämpfen. Im Rahmen einer adoptiven T-Zell-Therapie werden die zytotoxischen Eigenschaften von T-Zellen gegenüber Krebszellen *ex vivo* verstärkt. Werden diese T-Zellen dem Patienten reinjiziert, können sie zum Tumor wandern und diesen gezielter und effektiver bekämpfen (Weigelin *et al.*, 2011). Die Wirkung von T-Zellen kann unter anderem mit einem „retargeting device“ wie einem bsAk verstärkt werden, der T-Zellen sowohl aktiviert, als auch deren Kopplung an und zytotoxische Wirkung gegenüber Krebszellen vermitteln kann. Für den in der vorliegenden Arbeit verwendeten bsAk HEA125xOKT3 konnte *in vitro* gezeigt werden, dass er für aktivierte T-Zellen eine erhöhte Antitumorwirkung vermitteln kann (Strauß *et al.*, 1999). Die Verabreichung von Immuntoxinen stellt eine weitere Form der Immuntherapie dar, dabei werden Toxine mit einer für den Tumor spezifischen Zielkomponente gekoppelt, so dass sie ihre toxische Wirkung hochspezifisch gegenüber den Krebszellen ausüben (Fitzgerald *et al.*, 2011). Als Immuntoxin wurde in der vorliegenden Arbeit das PE38, ein Derivat des PEA, verwendet, dieses wurde mit humanem VEGF<sub>165</sub> oder einem gegen Her2/neu gerichteten Antikörperderivat gekoppelt. Für beide Konstrukte konnte in Studien eine Antitumorwirkung gezeigt werden (Behdani *et al.*, 2013; Becker & Benhar 2012). In der vorliegenden Arbeit sollten grundlegende Erkenntnisse für eine adoptive T-Zell-Therapie mit einem bsAk kombiniert mit einer Therapie mit Immuntoxinen erzielt werden. Durch Kombination von zwei Formen der Immuntherapie kann im Idealfall ein synergistischer Effekt erzielt werden, der zu einer effizienteren Behandlung bei gleichzeitig reduzierten Nebenwirkungen führen kann. Das Tumorgewebe von 205 Brustkrebspatientinnen wurde immunhistochemisch auf die Synthese der Tumormarker Her2/neu und EpCAM untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die gleichzeitige Überexpression beider Tumormarker ein Indikator für eine verminderte Überlebensrate war (Spizzo *et al.*, 2002). An humanen Tumormodellen in Mäusen konnte gezeigt werden, dass die gleichzeitige Behandlung von Her2-positivem Brustkrebs und der Tumolvaskulatur mit Immuntoxinen zu einem reduzierten Tumorwachstum führt (Hare *et al.*, 2013).

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob in primären T-Zellen durch eine Transfektion von Immuntoxin-kodierender mRNA die Sekretion von Immuntoxinen induziert werden kann und dieses zu einer Erhöhung der Effizienz in der bsAk-vermittelten T-Zell-Toxizität gegenüber Krebszellen führt. Die T-Zellen, die für die adoptive T-Zell-Therapie zum Einsatz kamen, wurden hierbei als Vektoren für das Delivery von Protein-basierten Immuntoxinen eingesetzt. Die Synthese der Protein-basierten Immuntoxine in T-Zellen wurde durch eine transiente Transfektion mit mRNA induziert, wobei der Einsatz von mRNA

verschiedene Vorteile bietet. Durch die Verwendung von mRNA wird im Unterschied zur plasmidbasierten Gentherapie das Risiko der Integration von Fremd-DNA in das Genom der T-Zelle vermieden (Hackett *et al.*, 2013). Über die Menge der für die Transfektion eingesetzten mRNA kann die Menge des rekombinant exprimierten Proteins reguliert werden (Holtkamp, 2007). Dies ist eine Möglichkeit, die Expression eines mRNA-kodierten Wirkstoffes zu regulieren. Zusätzlich ist die Expression zeitlich begrenzt, was ebenfalls eine exakt zu regulierende Dosierung des Medikamentes ermöglicht. Auch können Immuntoxin exprimierende T-Zellen durch mRNA-Transfektion innerhalb weniger Stunden hergestellt werden, wodurch sie im Rahmen einer klinischen Anwendung zu einem früheren Zeitpunkt einsetzbar sind.

T-Zellen eignen sich für das Delivery von Medikamenten wie Immuntoxinen, weil sie sich frei im Körper bewegen und auch aktiv zum Tumor wandern können. In *in vivo*-Studien an Mäusen konnten LAK-Zellen, die mit Immuntoxin-kodierendem Plasmid transduziert wurden, schon eine Stunde nach der Injektion am Tumor nachgewiesen werden (Chen *et al.*, 1997). Außerdem konnten brustkrebspezifische, fluoreszenzmarkierte T-Zellen, die in die Schwanzvene von Mäusen injiziert wurden, schon nach zwei Stunden an einem in der Flanke der Mäuse induziertem Brustkrebs nachgewiesen werden (Youniss *et al.*, 2014). In dieser wie in anderen T-Zell-Tracking-Studien wurde eine vermehrte Akkumulation von T-Zellen in den Lymphgefäßen, aber auch in Organen wie der Lunge und der Milz beobachtet (Youniss *et al.*, 2014; Chewning *et al.*, 2009). Die Tatsache, dass nicht alle T-Zellen den Tumor erreichen, ist generell ein limitierender Faktor der adoptiven T-Zell-Therapie (Vignali & Kallikourdis, 2017). Vor diesem Hintergrund ist das zweifache Targeting, das in dem hier beschriebenen Therapieansatz verwendet wird, von Vorteil, da das Immuntoxin ebenfalls krebsspezifisch wirkt und Nebenwirkungen in oben genannten Organen dadurch verringert werden können. Gegenüber Immunzellen wie Dendritischen Zellen bieten T-Zellen außerdem den Vorteil einer intrinsischen zytotoxischen Aktivität gegenüber Krebszellen, die über eine T-Zell-Aktivierung und den Einsatz von Retargeting-Devicen wie einem bsAk noch weiter verstärkt werden kann (Strauß *et al.*, 1999).

Für die Anwendung von T-Zellen als Therapeutikum ist die Vitalität der T-Zellen von Bedeutung, damit sie ihre maximale zytotoxische Wirkung gegenüber Krebszellen ausüben können. Da die Elektroporation für T-Zellen eine schonende Methode der Transfektion darstellt, wurde diese angewandt. Außerdem bietet die Elektroporation den Vorteil, dass keine weiteren Zusatzstoffe wie zum Beispiel Lipide verwendet werden, deren Einbringen in die T-Zelllösung bei einer Therapie Nebenwirkungen verursachen könnte. In der vorliegenden Arbeit wurden Protokolle für die Elektroporation der Zelllinie HEK293 und von primären, aktivierten T-Zellen mit einem Square Wave-Elektroporator etabliert beziehungsweise optimiert. Dabei konnte 24 h nach der Transfektion ein Anteil von  $88,5 \pm 7,1$  % eGFP-

positiven HEK293-Zellen beziehungsweise  $80,5 \pm 2,2$  % eGFP-positiver T-Zellen bei nicht beeinträchtigtger Zellvitalität erreicht werden. Mit dem für die Transfektion von aktivierten. Die Effizienz der Transfektion war damit vergleichbar mit einem Anteil von 80 - 90 % eGFP-positiver HEK293-Zellen nach einer Lipofektamin-Transfektion mit mRNA, die für zytoplasmatisches eGFP kodierte (Ejeskär *et al.*, 2006). Allerdings war die Vitalität bei der Transfektion mittels Lipofektamin auf circa 60 % reduziert, die in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Transfektion mittels Elektroporation ist also für den Einsatz in einer T-Zell-Therapie besser geeignet. Die Elektroporationsprotokolle wurden ebenso auf eine maximale Intensität des eGFP-Signals der einzelnen Zelle hin optimiert, da dadurch im Rahmen einer Therapie eine Maximierung des Wirkstoffes erreicht werden kann.

Für die Elektroporation von HEK293-Zellen wie auch für die von T-Zellen konnte in der durchflusszytometrischen Analyse eine relativ gleichmäßige Verteilung der Proteinexpression in den transfizierten Zellen beobachtet werden, was eine wichtige Voraussetzung für die therapeutische Anwendung der T-Zellen als Vektoren für das Delivery von Immuntoxinen ist. Bei der Transfektion einer reinen CD4<sup>+</sup> -T-Zell-Population und einer reinen CD8<sup>+</sup> -T-Zell-Population mit SP(i)-eGFP-mRNA ließ sich bei den CD4<sup>+</sup> -T-Zellen gegenüber den CD8<sup>+</sup> -T-Zellen ein um den Faktor 2,2 höherer Anteil eGFP-positiver T-Zellen beobachten. Diese unterschiedliche Effizienz bei der Transfektion von CD4<sup>+</sup> / CD8<sup>+</sup> -T-Zellen entspricht in der Tendenz einer Studie, bei der nach einer Transfektion mit CXCR2-kodierender mRNA 50 % CXCR2-positive CD4<sup>+</sup> -T-Zellen und 10 % CXCR2-positive CD8<sup>+</sup> -T-Zellen beobachtet werden konnten (Mitchell *et al.*, 2008). Es ist also davon auszugehen, dass die CD4<sup>+</sup> -T-Zellen den größten Anteil des Immuntoxins produzieren. Da die CD8<sup>+</sup> -T-Zellen für die zytotoxische Wirkung notwendig sind, wurde in der vorliegenden Arbeit die gemischte T-Zell-Population verwendet; es wurde zudem davon ausgegangen, dass die Immuntoxin-mRNA durch Elektroporation ähnlich wie die eGFP-mRNA in die Zellen eingebracht wird. Da identische Zellkulturen, gleiche Transfektionsprotokolle und identische mRNA-Synthesen verwendet wurden, wurde davon ausgegangen, dass 80 % der T-Zellen und 90 % der HEK293-Zellen in relativ einheitlichem Maße das Immuntoxin sekretieren können. Damit wurde eine günstige Menge erreicht, da eine gleichmäßige Verteilung innerhalb der Zellpopulation deren Kapazität optimal ausnutzen kann und der Anteil deutlich höher als bei der retroviralen Transfektion in anderen Studien lag. Zum Beispiel konnten durch die retrovirale Transfektion der zytotoxischen T-Zelllinie T15 mit einem VEGF-PE38-kodierenden Plasmid 25 - 35 % positiv transfizierte Zellen erreicht werden (Jin *et al.*, 2002). Mittels retroviraler Transduktion von T15-T-Zellen mit IL-4-DT Immuntoxin konnte in einer anderen Studie ein Anteil von 38 - 40 % positiv transfizierter Zellen erreicht werden (Vallera *et al.*, 2000).

Die Expression von mRNA-kodiertem, rekombinantem Protein konnte schon 2 h nach der Transfektion mittels Fluoreszenzmikroskopie für eGFP und 4 h nach der Transfektion mittels Western-Analyse für VEGF-PE38 und VEGF-PE38D nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse stimmen mit einer Studie überein, in der die Expression von zytosolischem eGFP in CD8<sup>+</sup>-T-Zellen schon 4 h nach einer Nukleofektion nachgewiesen werden konnte (Schaft *et al.*, 2006). Die Menge an eGFP in mRNA-transfizierten T-Zellen und HEK293-Zellen war über einen Zeitraum von 4 h bis 24 h nach der Transfektion maximal, wie mittels FACS-Analyse gezeigt werden konnte. Dies ist vergleichbar mit den Ergebnissen einer Studie, in der in Lymphozyten des peripheren Blutes 2 h nach einer Nukleofektion mit zytosolischem eGFP-mRNA ein deutliches eGFP-Signal zu detektieren war. Der Anteil an eGFP-positiven Zellen war an den Tagen eins und drei nach der Transfektion maximal und wie in unserer Studie war der geometrische Mittelwert der Fluoreszenzintensität an Tag eins maximal und nahm dann stetig ab (Zhao *et al.*, 2006). Für die Expression von Immuntoxin VEGF-PE38D in HEK293-Zellen konnte mittels Western Blot im Zelllysate eine maximale Expression 4 h bis 24 h nach der Transfektion gezeigt werden.

Über die Variation der Menge an mRNA, die für die Transfektion der T-Zellen mit mRNA eingesetzt wurde, ließ sich sowohl die Menge an eGFP als auch die Menge an Immuntoxin VEGF-PE38 und e23-PE38, die jeweils durch die T-Zellen exprimiert wurde, beeinflussen. Je mehr mRNA eingesetzt wurde, desto mehr rekombinantes Protein lag in den mRNA-transfizierten T-Zellen vor. Auch für die Menge des sekretierten Immunttoxins ließ sich eine Abhängigkeit von der Menge der eingesetzten mRNA nachweisen, womit davon ausgegangen werden konnte, dass die Menge des den T-Zellen zu sekretierenden Immunttoxins ebenfalls über die Menge der für die Transfektion eingesetzten mRNA zu beeinflussen war, was im Rahmen einer Therapie einen weiteren Parameter zur Regulation der Medikamentenapplikation darstellt. Da sowohl mittels durchflusszytometrischer Analyse des eGFP, als auch mittels Western-Analyse des Immunttoxins eine nicht lineare Abhängigkeit von der Menge der jeweils eingesetzten mRNA zu beobachten war, kann davon ausgegangen werden, dass die Menge des zu sekretierenden Immunttoxins durch den Einsatz von mehr mRNA nicht beliebig erhöht werden kann.

Mittels Live Cell Imaging konnte eGFP, dem ein ER-Signalpeptid von IFN $\gamma$ , IL-2 oder TGF- $\beta$ -2 vorangestellt war, sowohl in T-Zellen als auch in HEK293-Zellen in Strukturen des ER und des Golgi-Apparat lokalisiert werden. Durch Anfügen eines ER-Signalpeptids konnte die Translokation in das ER also erfolgreich initiiert werden. Somit wurde davon ausgegangen, dass der ER-Import des rekombinanten Immunttoxins ebenfalls durch das Anfügen des ER-Signalpeptids von IFN $\gamma$  oder des intrinsischen Signalpeptids von VEGF initiiert werden konnte.

Die Sekretion des Immuntoxins VEGF-PE38 durch T-Zellen konnte nachgewiesen werden, indem das Immuntoxin 8 h nach der Transfektion in zellfreiem Kulturüberstand detektiert wurde. Die Sekretion des attenuierten VEGF-PE38D konnte ebenfalls mittels ELISA mit zellfreiem Kulturüberstand von HEK293-Zellen nachgewiesen werden. Das attenuierte Immuntoxin konnte 8 h und 24 h nach der Transfektion auf maximalem Niveau im Überstand detektiert werden, woraus auf eine relativ gleichförmige Freisetzung des Wirkstoffs über einen Zeitraum von 24 h zu schließen war. Die Expression und Sekretion wird vermutlich durch die Stabilität der mRNA zeitlich begrenzt. Das noch mehrere Tage nach der Transfektion mit SP(i)-eGFP-mRNA erhöhte eGFP-Signal von T-Zellen und HEK293-Zellen ist vermutlich nicht auf eine andauernde Expression von rekombinantem Protein zurückzuführen, sondern darauf, dass zumindest ein Anteil des eGFP nicht sekretiert wird und darauf, dass das eGFP intrazellulär relativ stabil ist, da seine Halbwertszeit 17,5 h beträgt (Holtkamp *et al.*, 2006).

Für die in der vorliegenden Arbeit konstruierten Immuntoxine e23-PE38 und VEGF-PE38, die gegen Her2/neu bzw. gegen den VEGF-Rezeptor gerichtet sind, konnte mittels Western-Analyse eine vollständige Expression in transient transfizierten T-Zellen nachgewiesen werden. Die Analyse der Vitalität der Immuntoxin exprimierenden T-Zellen ließ vermuten, dass die Immuntoxine auch gegenüber den T-Zellen eine spezifische zytotoxische Aktivität zeigten. Bei einer spezifischen Wirkung wird die ADP-Ribosylierung des Elongationsfaktor-2 durch die Toxindomäne des PEA gebunden und dadurch die Proteinsynthese der Zelle gehemmt (Siegall *et al.*, 1991). Aufgrund der verzögert einsetzenden Verminderung der Vitalität kann eine Schädigung durch das mit dem eGFP entwickelten Elektroporations-Protokoll weitestgehend ausgeschlossen werden. Auch die Konzentrationsabhängigkeit der zytotoxischen Wirkung der Immuntoxine und die relativ starke Wirkung unterstützt die Vermutung, dass die Wirkung spezifisch ist. Im direkten Vergleich von VEGF-PE38D mit VEGF-PE38 konnte für VEGF-PE38D eine höhere Expressionsrate gezeigt werden, was ebenfalls als Indikator für die spezifische Toxizität des nicht attenuierten Immuntoxins gegenüber den T-Zellen gewertet wurde (Han & Galloway, 1995). Dabei wird davon ausgegangen, dass die Toxindomäne des PE38 an den im Zytosol der T-Zelle vorliegenden Elongationsfaktor-2 bindet. Geht man von einer spezifischen Wirkung der Immuntoxine aus, also davon, dass die Toxindomäne des PE38 an den im Zytosol der T-Zelle vorliegenden Elongationsfaktor-2 bindet, so muss auch davon ausgegangen werden, dass diese in das Zytosol der Zellen gelangt war. Das könnte zum Beispiel durch Sekretion und anschließende Wiederaufnahme des Immuntoxins geschehen sein. Da T-Zellen Her2/neu-negativ sind, sollte hier eher von einer unspezifischen Aufnahme ausgegangen werden. VEGF-Rezeptoren werden von T-Zellen nur in geringem

Maße exprimiert, weshalb dieser Effekt in einem *in vitro*-Versuch mit einer VEGF-Rezeptor überexprimierenden Zelllinie oder in einem *in vivo*-Versuch stark reduziert sein sollte.

Im Rahmen einer adoptiven T-Zell-Therapie kann eine verminderte Vitalität der T-Zellen einen Einfluss auf die Funktion der T-Zellen und damit auf den Erfolg der Therapie haben. Die zytotoxische Aktivität des Immuntoxins VEGF-PE38 gegenüber den transfizierten T-Zellen könnte die Expression von Immuntoxin limitieren und auch die intrinsische zytotoxische T-Zell-Aktivität beeinträchtigen, was im Rahmen einer Kombinationstherapie einen Nachteil bedeuten würde. Unter anderem um abzuklären, ob es sich bei der zytotoxischen Wirkung um eine spezifische Wirkung der Immuntoxine handelte, wurde bei dem Immuntoxin VEGF-PE38 im katalytischen Zentrum der Toxindomäne eine Mutation eingefügt, die eine starke Reduktion der Toxizität zur Folge haben sollte. Es handelte sich um den Austausch eines Glutamats zu Aspartat im katalytischen Zentrum der Toxindomäne. Für diese Mutation konnte im nativen PEA eine Reduktion der Toxizität um den Faktor 10.000 gezeigt werden (Douglas *et al.*, 1987). Da in der Studie von Lukac & Collier (1988) davon ausgegangen wurde, dass der Austausch von Glu553 durch Asp553 im katalytischen Zentrum des nativen PEA keine nennenswerte Änderung der Proteinkonformation bewirkt, wurde in der vorliegenden Arbeit davon ausgegangen, dass das Einfügen derselben Mutation im attenuierten Immuntoxin VEGF-PE38D keinen nennenswerten Einfluss auf die Mechanismen der Expression, der folgenden Prozessierung und der Sekretion hat. Bei T-Zellen, die das attenuierte Immuntoxin VEGF-PE38D exprimierten, konnte im Unterschied zu T-Zellen, die VEGF-PE38 exprimierten auch bei hohen mRNA-Mengen kein toxischer Effekt gegenüber den T-Zellen beobachtet werden. Durch den Austausch einer Base konnte die Toxizität des Immuntoxins also erfolgreich so weit vermindert werden, dass kein Effekt auf die Vitalität der T-Zellen zu detektieren war. Der beobachtete Effekt der attenuierten Variante unterstützte die Vermutung, dass die Immuntoxine spezifisch wirken. Deshalb wurde davon ausgegangen, dass die Immuntoxine VEGF-PE38 und e23-PE38 funktionell waren.

Hieraus konnte geschlossen werden, dass das intrinsische ER-Signalpeptid des VEGF<sub>165</sub> den Transport des Immuntoxins in das Lumen des ER initiiert hat, was die Voraussetzung für eine erfolgreiche Sekretion ist der Transport des Immuntoxins in das Lumen des ER der Zelle, wobei das ER-Signalpeptid durch die Signalpeptidase abgespalten wird (Lang *et al.*, 2017). Mittels MALDI-ToF-Analyse des Immuntoxins VEGF-PE38D konnte gezeigt werden, dass ein Teil des rekombinanten Immuntoxins korrekt durch eine Spaltung durch die Signalpeptidase prozessiert wurde. Allerdings wurde auch VEGF-PE38D mit vollständigem Signalpeptid nachgewiesen, was darauf hinwies, dass das Immuntoxin nicht vollständig sekretiert wurde. Wahrscheinlich wurde nur ein Anteil des Immuntoxins vollständig prozessiert und sekretiert, der Rest verblieb wahrscheinlich im

Zytosol der Zelle, was die toxische Wirkung des Immuntoxins gegenüber den T-Zellen erklären würde. Auch in T-Zellen, die eGFP mit einem der ER-Signalpeptide von IFN $\gamma$ , IL-2 oder TGF- $\beta$ -2 exprimierten, konnte das anfangs in ER-förmigen Strukturen lokalisierte rekombinante Protein 24 h nach der Transfektion in der gesamten Zelle detektiert werden, was darauf schließen ließ, dass es im Zytosol vorlag. Mögliche Erklärungen wären, dass eGFP wieder aus dem ER in das Zytosol exportiert oder dass es nicht oder nur teilweise in das ER importiert wurde. Derselbe zeitliche Verlauf der eGFP-Verteilung konnte mit HEK293-Zellen gezeigt werden. Das weist darauf hin, dass die Sekretion eines Anteils des rekombinanten Proteins nicht spezifisch für das Immuntoxin ist. Ein Verbleib des Immuntoxins in der Zelle kann auch darauf zurückzuführen sein, dass die Translokation der Proteine in das ER gestört war oder dass die Sekretion des Immuntoxins nur unvollständig abgelaufen war. Die Toxindomäne von PE38 endet C-terminal mit der REDLK-Sequenz, die im PEA extrazellulär durch Abspalten des C-terminalen Lysins aktiviert wird und nach dem ER-Import als REDL an den KDEL-Rezeptor bindet (Weldon & Pastan, 2011). Dadurch wird der Rücktransport des Proteins vom Golgi-Apparat in das ER initiiert. Auch wenn für REDLK gezeigt wurde, dass es nicht an den KDEL-Rezeptor bindet (Kreitman & Pastan, 1995), kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Sekretion gestört ist und das Immuntoxin in der Zelle verbleibt. Für PEA ist gezeigt worden, dass es unter Nutzung verschiedener Wege von der Plasmamembran zum ER gelangen kann (Smith *et al.*, 2006). Der Anteil des Immuntoxins, der im Zytosol verblieb, könnte für die toxische Wirkung verantwortlich sein. Außerdem wird aufgrund des Verbleibs von Immuntoxin im Zytosol oder anderen Zellkompartimenten weniger Immuntoxin sekretiert und die toxische Wirkung des Immuntoxins auf die T-Zellen kann die Sekretion zusätzlich beeinträchtigen. Dieses Ergebnis widerspricht der Hypothese, die besagt, dass ein PE38-basiertes Immuntoxin, dem ein ER-Signalpeptid vorangestellt ist, über den sekretorischen Weg sekretiert wird und nicht toxisch für die exprimierende Zelle ist, da der Wirkort im Zytosol liegt (Chen *et al.*, 1997).

Obwohl sowohl die zytotoxische Wirkung als auch die Sekretion der Immuntoxine gezeigt werden konnte, konnte keine zytotoxische Wirkung der Immuntoxine gegenüber den jeweiligen Zielzellen gezeigt werden. In einer Studie, in der das Immuntoxin anti-VEGFR/PE38, bei dem PE38 mit einem gegen VEGFR-2 gerichteten Antikörper chemisch konjugiert ist, sowohl gegenüber HUVEC-Zellen, als auch gegenüber MCF-7-Zellen eine leicht toxische Wirkung zeigte, konnte nur für HUVEC-Zellen das Auslösen von Apoptose gezeigt werden (Safari *et al.*, 2014). Auch konnte gezeigt werden, dass die Injektion eines VEGF-PE38 kodierenden Plasmids in Tumore von U251 Xenograft-Mäusen das Tumorwachstum deutlich hemmte (Hu *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2010). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Kokultivierung von HUVEC-Zellen mit T-Zellen zu einer vermehrten

Ausbildung von Tubes führte. Dieser Effekt wurde bei Immuntoxin sekretierenden T-Zellen aufgehoben. Über die Anzahl von Tubes im Tube-Formation Assay wurde in einer anderen Studie die  $IC_{50}$  des Immuntoxins VEGF<sub>121</sub>/rGel mit 1 nM gegenüber VEGFR-2-positiven Zellen bestimmt (Mohamedali *et al.*, 2011). Mor *et al.* (2004) konnten zeigen, dass aktivierte T-Zellen VEGF sekretieren, woraus die Autoren schlossen, dass die Kokultivierung mit T-Zellen die Angiogenese im Tube-Formation-Assay fördert. Das könnte den deutlichen Effekt der proliferierenden T-Zellen auf die Ausformung von kapillarförmigen Strukturen im Tube-Formation-Assay erklären, der bei den nicht proliferierenden VEGF-PE38-sekretierenden T-Zellen nicht zu beobachten war. Deshalb kann nicht ausgeschlossen werden, dass dieser Effekt nur auf die verringerte Proliferation zurückzuführen war. In einem Chick-Chorioallantoic-Membran-Assay einer weiteren Studie konnte für den Überstand von HEK293-Zellen, die ein Plasmid-kodiertes VEGF-PE38 exprimierten die Hemmung der Ausbildung von kapillarförmigen Strukturen gezeigt werden (Hu *et al.*, 2010). Um auszuschließen, dass die unspezifische zytotoxische Wirkung der T-Zellen die zytotoxische Wirkung des Immuntoxins überdecken, wurde die zytotoxische Wirkung von zellfrei geerntetem Kulturüberstand von VEGF-PE38-sekretierenden und e23-PE38-sekretierenden T-Zellen gegenüber HUVEC-Zellen respektive SK-OV-3-Zellen getestet. Mit diesem Experiment konnte ebenfalls für keines der Immuntoxine eine toxische Wirkung nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die effektive Dosis von PEA im Tube-Formation-Assay mit größer als 5 µg/ml bestimmt. Von der für das PEA ermittelten effektiven Dosis kann aber nicht auf die effektive Dosis des VEGF-PE38 geschlossen werden, da das Immuntoxin von den HUVEC-Zellen spezifisch aufgenommen wird, diese wird voraussichtlich deutlich geringer sein. In einer Studie konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass das Anfügen der Zielkomponente VEGF<sub>121</sub> die  $IC_{50}$  des Immuntoxins VEGF<sub>121</sub>/rGel um einen Faktor deutlich größer als 1.000 erhöht (Mohamedali *et al.*, 2011). Von einer spezifischen Aufnahme des PEA durch die HUVEC-Zellen wird nicht ausgegangen, da diese den Membranrezeptor CD91 nicht exprimieren.

In einem *in vitro* -Zytotoxizitäts-Assay, bei dem T-Zellen über den bsAk HEA125xOKT3 mit Krebszellen gekoppelt und dadurch aktiviert wurden, konnte keine Wirkung des Immuntoxins nachgewiesen werden. Aufgrund der Kopplung der T-Zellen mit den Krebszellen über den bsAk wurde davon ausgegangen, dass das Immuntoxin in unmittelbarer Nähe der Krebszelle freigesetzt wurde und durch die Aktivierung die Sekretion der T-Zelle erhöht war (Strauß *et al.*, 1999). Dadurch sollte die Sekretion des Immuntoxins optimiert werden. Da die spezifische Toxizität der Immuntoxine gezeigt werden konnte, konnte davon ausgegangen werden, dass sie in den Zielzellen ihre toxische Wirkung ausüben können, was in diesem *in vitro* -Zytotoxizitäts-Assay aber nicht gezeigt werden konnte. Ein direkter Vergleich der Toxizität der e23-PE38-exprimierenden T-Zellen

mit den nicht transfizierten T-Zellen war mit diesem Assay allerdings nicht möglich, da für Immuntoxin exprimierende T-Zellen eine starke Hemmung der Proliferation gezeigt wurde. Es ist davon auszugehen, dass dieses auch für die T-Zellen in der Kokultur zutrifft; im bsAk-vermittelten Zytotoxizitäts-Assay wurden 48 h nach der Transfektion circa viermal mehr T-Zellen als VEGF-PE38-sekretierende T-Zellen ausgezählt. Das führt zu einer deutlichen Reduktion der zytotoxischen Wirkung der T-Zellen, was erklären kann, warum eine Toxizität der Immuntoxine gegenüber den Zielzellen nicht zu detektieren war während gleichzeitig eine toxische Wirkung der Immuntoxine gegenüber den transfizierten T-Zellen und HEK293-Zellen beobachtet wurde. Zudem hat die toxische Wirkung des Immuntoxins die Vitalität der T-Zellen beeinträchtigt und deshalb vermutlich zu einer verminderten zytotoxischen Wirkung der T-Zellen gegenüber den SK-OV-3-Zellen geführt, die einen Vergleich der transfizierten mit den nicht transfizierten T-Zellen ebenfalls erschwert. Berücksichtigt man diese beiden Faktoren und die daraus resultierende stark reduzierte zytotoxische Wirkung der T-Zellen, so kann nicht ausgeschlossen werden, dass das Immuntoxin eine Wirkung gegenüber den SK-OV-3 oder den HUVEC-Zellen haben, die allerdings vor diesem Hintergrund nicht herausgearbeitet werden konnte.

Dass die Wirkung der Immuntoxine gegenüber den T-Zellen, nicht aber gegenüber den Zielzellen, nachgewiesen werden konnte, kann ebenso darauf zurückzuführen sein, dass keine ausreichend hohe Konzentration im Medium erreicht wurde. Eine Quantifizierung des Immuntoxins sowohl im Western Blot, als auch im ELISA war aufgrund eines fehlenden Referenzproteins nicht möglich. Eventuell war die Konzentration des Immuntoxins im Medium zu gering, um einen toxischen Effekt gegenüber den Zielzellen nachweisen zu können. In einer Studie, in der HEK293T-Zellen transient ein plasmid-kodiertes, scFv-basiertes Immuntoxin exprimierten, konnte im mittels Affinitätschromatographie aufgereinigtem Überstand das vollständige Immuntoxin detektiert werden. Mittels Bradford-Assay wurde die Konzentration des Immuntoxins im Zellkulturüberstand mit 4 mg/l bestimmt (Menzel *et al.*, 2008). In einem Chick-Chorioallantoic-Membran-Assay konnte durch die Freisetzung von  $1396 \pm 131,9$  pg eines Plasmid-basierten VEGF-PE38-Immuntoxins durch  $1 \times 10^4$  HEK293-Zellen innerhalb von 48 h ein Effekt des zellfreien Kulturüberstandes auf die Bildung von kapillarähnlichen Strukturen gezeigt werden (Hu *et al.*, 2010).

Eine weitere Erklärung für die fehlende Toxizität der Immuntoxine kann ihre geringe extrazelluläre Stabilität sein. Dafür spricht auch, dass keine Anreicherung des Immuntoxins im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden konnte. Generell hängt die Stabilität von der Größe des rekombinanten Proteins ab; je größer das Immuntoxin, desto länger ist seine Halbwertszeit im Blut. Allerdings verringert sich die Fähigkeit, den Tumor zu durchdringen mit zunehmender Größe, weshalb man bei der Entwicklung neuer Therapien trotzdem auf kleine Komplexe setzt. Für das scFv-basierte Immuntoxin 4D5/rGel, das mit 54 kDa eine

vergleichbare Masse wie die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Immuntoxine hat, wurde bei einer direkten Applikation in Mäusen eine Halbwertszeit von 35 min nachgewiesen (Cao *et al.*, 2014). Die Halbwertszeit des Immuntoxins scFv-BR96-PE40, dessen Molekulargewicht circa 65 kDa beträgt, wurde im Plasma von Patienten bei der Behandlung von metastasierenden, soliden Tumoren mit 2,5 h bestimmt (Posey *et al.*, 2002). Bei der intravenösen Gabe von Immuntoxinen werden diese in der klinischen Praxis deshalb in regelmäßigen Abständen verabreicht. In klinischen Studien der Phase I wurde das PE40-basierte Immuntoxin SGN-10 an den Tagen eins, vier, acht und elf injiziert, gefolgt von einer zweiten Injektionsreihe zwei Wochen später (Posey *et al.*, 2002).

In der vorliegenden Arbeit waren wir in der Lage, mittels mRNA-Transfektion humane primäre T-Zellen herzustellen, die die vollständigen, aktiven Immuntoxine VEGF-PE38 und e23-PE38 exprimierten und sekretierten. Mit der hier gezeigten Expression und Sekretion der Immuntoxine war es möglich, eine konstante Freisetzung eines Immuntoxins über einen Zeitraum von mindestens 24 h zu gewährleisten, was aufgrund der relativ geringen Halbwertszeit von Immuntoxinen einen Vorteil gegenüber der intravenösen Applikation von Immuntoxinen darstellt. Gegenüber der Vektor-basierten Expression von Immuntoxinen bietet die Verwendung von mRNA hierbei zusätzlich den Vorteil einer Terminierung der Medikamentenfreisetzung. Auch konnte gezeigt werden, dass die Menge des freigesetzten Immuntoxins durch Variation der mRNA-Menge zu variieren war. Durch Zugabe des bsAk HEA125xOKT3 war es möglich, die Toxizität der Immuntoxin sekretierenden T-Zellen gegenüber Krebszellen in einem *in vitro*-Zytotoxizitäts-Assay zu erhöhen. Damit konnte gezeigt werden, dass humane, primäre T-Zellen durch eine mRNA-Transfektion als Vektoren für zelltoxische Immuntoxine genutzt werden können. Eine Optimierung dieses Ansatzes könnte erreicht werden, indem die toxische Wirkung des Immuntoxins gegenüber den T-Zellen verringert und gleichzeitig gegenüber den Zielzellen erhöht würde. Eine Erhöhung der Toxizität speziell gegenüber den Zielzellen würde zum Beispiel durch eine Aktivierung des Immuntoxins erreicht werden können. Für das Abspalten des N-terminalen Lysins durch eine Peptidase konnte eine erhöhte zytotoxische Aktivität eines PE38-basierten Immuntoxins gezeigt werden (Reiter *et al.*, 1994). Eine Möglichkeit, die Halbwertszeit von Immuntoxinen zu erhöhen, besteht darin, sie gegen extrazellulären Abbau zu schützen. In einer *in vitro*-Studie wurde eine Albumin-Bindestelle in ein gegen Her2/neu gerichtetes PE38-basiertes Immuntoxin integriert, wodurch die IC<sub>50</sub> fast um den Faktor drei erhöht werden konnte (Liu *et al.*, 2014). Der Einsatz eines Immuntoxins mit abgeschwächter Toxizität könnte ebenfalls diesen Effekt haben, wenn hierbei die T-Zell-Funktion weitestgehend erhalten bliebe, während das Immuntoxin noch eine ausreichende Wirksamkeit gegenüber den Zielzellen zeigt. Dies könnte zum Beispiel durch das Einfügen einer einfachen Mutation im aktiven Zentrum von PE38 erreicht werden.

Der Austausch der Aminosäure Tyrosin 481 des nativen PEA zu Phenylalanin führte zu einer Reduktion der spezifischen Zytotoxizität um den Faktor zehn und der spezifischen ADP-Ribosyltransferase-Aktivität um den Faktor 14 (Lukac & Collier, 1988). Die kontrollierte Freisetzung von Immuntoxinen durch Immunzellen stellt einen großen Vorteil gegenüber der intravenösen Gabe von Immuntoxinen dar, da eine effektive Konzentration am Wirkort über einen deutlich längeren Zeitraum gewährleistet werden kann. Diese Verwendung von T-Zellen als Vektoren für das Delivery von Immuntoxinen bietet außerdem den Vorteil, dass diese aktiv zum Wirkort wandern. Berücksichtigt man die direkte Applikation, so kann davon ausgegangen werden, dass durch das hier vorgestellte Konzept die effektive Dosis des Immuntoxins am Wirkort erhöht werden kann und dadurch die Nebenwirkungen reduziert werden können.

## 6 Literaturverzeichnis

**Aparicio S, Sawant S, Lara N, Barnstable CJ, Tombran-Tink J.** Expression of angiogenesis factors in human umbilical vein endothelial cells and their regulation by PEDF. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; **326**: 387-394.

**Artimo P, Jonnalagedda M, Arnold K, Baratin D, Csardi G, de Castro E, Duvaud S, Flegel V, Fortier A, Gasteiger E, Grosdidier A, Hernandez C, Ioannidis V, Kuznetsov D, Liechti R, Moretti S, Mostaguir K, Redaschi N, Rossier G, Xenarios I, Stockinger H.** ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acid Res* 2012; **40**: W597-603.

**Atkins MB.** Immunotherapy and experimental approaches for metastatic melanoma. *Hematol Oncol Clin North Am* 1998; **12**: 877-902.

**Avarbock AB, Loren AW, Park JY, Junkins-Hopkins JM, Choi J, Litzky LA, Rook AH.** Lethal vascular leak syndrome after denileukin diftitox administration to a patient with cutaneous gamma/delta T-cell lymphoma and occult cirrhosis. *Am J Hematol* 2008; **83**: 593-600.

**Baker PR & Clauser KR.** <http://prospector.ucsf.edu>.

**Bang YJ, Cutsem EV, Feyereislova A, Chung HC, Shen L, Sawaki A, Lordik F, Ohtsu A, Yasushi O, Satoh T, Aprile G, Kulikov E, Hill J, Lehle M, Rüschoff J, Kang YK.** Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for the treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomized controlled trial. *Lancet* 2010; **376**: 687-697.

**Baskar S & Muthusamy N.** Antibody-based Therapeutics for the treatment of human B cell Malignancies. *Curr Allergy Asthma Rep* 2013; **13**: 33-44.

**Batra JK, Kasprzyk PG, Bird RE, Pastan I, Richter King C.** Recombinant anti-erbB2 immunotoxins containing Pseudomonas exotoxin. *Proc Natl Acad Sci* 1992; **89**: 5867-5871.

**Batrakova EV, Gendelman HE, Kabanov AV.** Cell-mediated drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv* 2011; **8**: 415-433.

**Batrakova EV.** Using Immune Cells for Transport of Therapeutics to Brain Tumors. *M J Canc* 2016; **2**: 008.

**Beatty GL & Gladney WL.** Immune Escape Mechanisms as a Guide for Cancer Immunotherapy. *Clin Canc Res* 2015; **21**: 687-692.

**Becker N & Benhar I.** Antibody-Based Immunotoxins for the Treatment of Cancer. *Antibodies* 2012; **1**: 39-69.

**Behdani M, Zeinali S, Karimipour M, Khanahmad H, Schoonoghe S, Aslemarz A, Seyes N, Moazami-Godarzi R, Baniahmad F, Habibi-Anbouhi M, Hassanzadeh-Ghassabeh G, Muyldermans S.** Development of VEGFR2-specific Nanobody Pseudomonas exotoxin A conjugated to provide efficient inhibition of tumor cell growth. *Nat Biotechnol* 2013; **30**: 205-209.

Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Robert Koch Institut. Berlin, November 2016.

- Bogdanov AM, Bogdanov EA, Chudakov DM, Gorodnicheva TV, Lukyanov S, Lukyanov KA.** Cell culture medium affects GFP photostability: a solution. *Nat Methods* 2009; **12**: 859-860.
- Bradford MM.** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; **72**: 248-254.
- Breart B, Lemaitre F, Celli S, Bouso P.** Two-photon imaging of intratumoral CD8<sup>+</sup>-T cell therapy in mice. *J Clin Invest* 2008; **118**:1390-1397.
- Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri GM, Carnemolla B, Orecchia P, Zardi I, Righetti PG.** Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* 2004; **25**: 1327-1333.
- Cao Y, Marks JD, Marks JW.** Construction and Characterisation of Novel, Recombinant Immunotoxins Targeting the Her2/neu Oncogene Product: *In vitro* and *In vivo* Studies. *Canc Res* 2009; **69**: 8987-8995.
- Cao Y, Marks WM, Liu Z, Cheung LH, Hittelman WN, Rosenblum MG.** Design Optimization and Characterization of Her2/neu-Targeted Immunotoxins: Comparative *In Vitro* and *In Vivo* Efficacy Studies. *Oncogene* 2014; **33**: 429-439.
- Carpentier G.** Angiogenesis Analyzer for ImageJ. ImageJ User and Developer Conference. Mondorf-les-Bains, Luxemburg. October 2012.
- Chen SY, Yang AG, Chen JD, Kute T, King CR, Collier J, Cong Y, Yao C, Huang XF.** Potent antitumour activity of a new class of tumour-specific killer cells. *Nature* 1997; **385**: 78-80.
- Chen X, Zaro JL, Shen WC.** Fusion protein linkers: Property, design and functionality. *Adv Drug Deliv Rev* 2012; **65**: 1357-1369.
- Chewning JH, Dugger KJ, Chaudhuri TR, Zinn KR, Weaver CT.** Bioluminescence-based visualization of CD4 T cell dynamics using a T lineage-specific luciferase transgenic model. *BMC Immunol* 2009; **10**: 44.
- Cormack BP, Valdivia RH, Falkow S.** FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 1996; **173**: 33-38.
- Deeks ED.** Nivolumab: A Review of its Use in Patients with Malignant Melanoma. *Drugs* 2014; **74**: 1233-1239.
- Denton PW, Long JM, Wietrefre SW, Sykes C, Spagnuolo RA, Snyder OD, Perkey K, Archin NM, Choudhary SK, Yang K, Hudgens MG, Pastan I, Haase AT, Kashuba AD, Berger EA, Margolis DM, Garcia JV.** Targeted Cytotoxic Therapy Kills Persisting HIV Infected Cells During ART. *PLOS* 2014; **10**: e1003872.
- Douglas CM & Collier RJ.** Exotoxin A of *Pseudomonas aeruginosa*: substitution of glutamic acid 553 with aspartic acid drastically reduces toxicity and enzymatic activity. *J Bacteriol* 1987; **169**: 4967-4971.
- Dudley ME, Gross CA, Langan MM, Garcia MR, Sherry RM, Yang JC, Phan GQ, Kammula US, Huges MS, Citrin DE, Restifo NP, Wunderlich J, Prieto PA, Hong JJ, Langan RC, Zlott DA, Morton KE, White DE, Laurencot C, Rosenberg SA.** CD8<sup>+</sup> enriched "young" tumor infiltrating lymphocytes can mediate regression of metastatic melanoma. *Clin Canc Res* 2010; **16**: 6122-6131.

- Eggers R, Philippi A, Altmeyer MO, Breinig F, Schmitt MJ.** Primary T cells for mRNA-mediated immunotoxin delivery. *Gene Therapy* 2018; **25**: 47-53.
- Ejeskär K, Fransson S, Zaibak F, Ioannou PA.** Method for Efficient Transfection of *in vitro*-Transcribed mRNA into SK-N-AS and HEK293 cells: Difference in the Toxicity of Nuclear EGFP Compared to Cytoplasmic EGFP. *Int J Mol Med* 2006; **17**: 1011-1016.
- Fachinformation Avastin®, Zulassung: 12. Januar 2015, Roche Registration GmbH.
- Ferrara N, Hillan KJ, Novotny W.** Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy. *Biophys Biochem Res Commun* 2005; **333**: 328-335.
- Fitzgerald DJ, Wayne AS, Kreitman RJ, Pastan I.** Treatment of Hematologic Malignancies with Immunotoxins and Antibody-Drug Conjugates. *Canc Res* 2011; **71**: 6300-6309.
- Fitzgerald JC, Weiss SL, Maude SL, Barrett DM, Lacey SF, Melenhorst JJ, Shaw P, Berg RA, June CH, Porter DL, Frey NV, Grupp SA, Teachey DT.** Cytokine Release Syndrome After Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapy for Acute Lymphoblastic Leukemia. *Crit Care Med* 2017; **45**: e124-e131.
- Frankel AE, Fleming DR, Powell BL, Gartenhaus R.** DAB389IL2 (ONTAK®) fusion protein therapy of chronic lymphocytic leukemia. *Exp Opin Biol Ther* 2003; **3**: 179-186.
- Guzmán-Hernández ML, Potter G, Egervári K, Kiss JZ, Balla T.** Secretion of VEGF-165 has Unique Characteristics, Including Shedding from the Plasma Membrane. *Mol Biol Cell* 2014; **25**: 1061-1072.
- Hackett PB, Largaespada DA, Switzer KC, Cooper LJJ.** Evaluating risks of insertional mutagenesis by DNA transposons in gene therapy. *Transl Res* 2013; **161**: 265-283.
- Han XY & Galloway DR.** Active Site Mutations of *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A Analysis of the His Residue. *J Biol Chem* 1995; **270**: 679-684.
- Hare JI, Moase EH, Allen TM.** Targeting combinations of liposomal drugs to both tumor vasculature cells and tumor cells for the treatment of HER2-positive breast cancer. *J Drug Target* 2013; **21**: 87-96.
- Holtkamp S, Kreiter S, Selmi A, Simon P, Koslowski M, Huber C, Türeci Ö, Sahin U.** Modification of antigen-encoding RNA increases stability, translational efficacy, and T-cell stimulatory capacity of dendritic cells. *Blood* 2006; **108**: 4009-4017.
- Holtkamp S.** RNA-basierte Impfstoffe zur Induktion optimaler Immunantworten. Dissertation, 2007.
- Hu CC, Ke YQ, Sun XL, Jiang XD, Xu RX, Lv J.** Human mesenchymal stem cells-like cells as cellular vehicles for delivery of immunotoxin *in vitro*. *Biotechnol Lett* 2009; **31**: 181-189.
- Hu CC, Ji HM, Chen SL, Zhang HW, Wang BQ, Zhou LY, Zhang ZP, Sun XI, Chen ZZ, Cai YQ, Qin LS, Jiang XD, Xu RX, Ke YQ.** Investigation of a plasmid containing a novel immunotoxin VEGF165-PE38 gene for antiangiogenic therapy in a malignant glioma model. *Int J Cancer* 2010; **127**: 2222-2229.
- Hwang J, Fitzgerald DJ, Adhya S, Pastan I.** Functional domains of pseudomonas exotoxin identified by deletion analysis of the gene expressed in *E. coli*. *Cell* 1987; **48**: 129-136.

- Jin N, Chen W, Blazar BR, Ramakrishnan S, Vallera DA.** Gene therapy of murine solid tumors with T cells transduced with a retroviral vascular endothelial growth factor-immunotoxin target gene. *Hum Gene Ther* 2002; **13**: 497-508.
- Kasprzyk PG, Song SU, Di Fiore PP, King CR.** Therapy of an Animal Model of Human Gastric Cancer Using a Combination of Anti-erbB-2 Monoclonal Antibodies. *Canc Res* 1992; **52**: 2771-2776.
- Köhler U & Wagner T.** New Software from Eurofins MWG Operon optimizes Sequences for Gene Synthesis. *Transkript* 2007; **11**: 1.
- Kreitman RJ & Pastan I.** Importance of the glutamate residue of KDEL in increasing the cytotoxicity of *Pseudomonas* exotoxin derivatives and for increased binding to the KDEL receptor. *Biochem J* 1995; **307**: 19-37.
- Laborlexikon® „Facharztwissen für alle!“ e-Journal für Labormedizin, ISSN 1860 966X. <http://www.laborlexikon.de/>
- Laemmli UK.** Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 1970; **227**: 680-685.
- Lamond NWD & Younis T.** Pertuzumab in human epidermal growth-factor receptor 2-positive breast cancer: clinical and economic considerations. *Int J Womens Health* 2014; **6**: 509-521.
- Lang S, Pfeffer S, Lee PH, Cavalié A, Helms V, Förster F, Zimmermann R.** An update on Sec61 Channel Functions, Mechanisms, and Related Diseases. *Front Physiol* 2017; **8**: 1-22.
- Liu H, Seijsing J, Frejd FY, Tolomachev V, Grälsund T.** Target-specific cytotoxic effects on Her2-expressing cells by the tripartite fusion toxin ZHER2:2891-ABD-PE38X8, including a targeting affibody molecule and a half-life extension domain. *Int J Oncol* 2014; **47**: 601-609.
- Lukac M & Collier RJ.** Restoration of Enzymic Activity and Cytotoxicity of Mutant, E553C, *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A by Reaction with Iodacetic Acid. *J Bio Chem* 1988; **263**: 6146-6149.
- MacLean B, Tomazela DM, Shulman N, Chambers M, Finney GL, Frewen B, Kern R, Tabb DL, Liebler DC, MacCoss MJ.** Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. *Bioinformatics* 2010; **26**: 966-968.
- Menzel C, Schirrmann T, Konthur Z, Jostock T, Dübel S.** Human antibody RNase fusion protein targeting CD30+ lymphomas. *Blood* 2008; **111**: 3830-3837.
- Mitchell DA, Karikari I, Cui X, Xie W, Schmittling R, Sampson JH.** Selective Modification of Antigen-Specific T Cells by RNA Electroporation. *Hum Gene Ther* 2008; **19**: 511-521.
- Mohamedali KA, Ran S, Gomez-Manzano C, Ramdas L, Xu J, Kim S, Cheung LH, Hittelman WN, Zhang W, Waltenberger J, Thorpe PE, Rosenblum MG.** Cytotoxicity of VEGF121/rGel on vascular endothelial cells resulting in inhibition of angiogenesis is mediated via VEGFR-2. *BMC Cancer* 2011; **11**: 358.
- Mor F, Quintana FJ, Cohen IR.** Angiogenesis-Inflammation Cross-Talk: Vascular Endothelial Growth Factor Is Secreted by Activated T Cells and Induces Th1 Polarization. *J Immunol* 2004; **172**: 4618-4623.
- Mülhardt C.** Der Experimentator - Molekularbiologie/Genomics. 6. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2013; 139-146.

National Center for Biotechnology Information: [www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)

**Niederman TMJ, Ghogawala Z, Carter BS, Tompkins HS, Russel MM, Mulligan RC.** Antitumor activity of cytotoxic T lymphocytes engineered to target vascular endothelial growth factor receptors. *Proc Natl Acad Sci* 2002; **99**: 7009-7014.

**O'Donnell JS, Teng MWL, Smyth MJ.** Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol* 2018; **1**.

**Papadopoulus N, Martin J, Ruan Q, Rafique A, Rosconi MP, Shi E, Pyles EA, Yancopoulos GD, Stahl N, Wiegand SJ.** Binding and neutralization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and related ligands by VEGF Trap, ranibizumab and bevacizumab. *Angiogenesis* 2012; **15**: 171-185.

**Pastan I, Benhar I, Padlan EA, Jung SH, Lee B.** 1999, *Humanized B3 antibody fragments, fusion proteins, and uses thereof*. US5889157A.

**Pereboeva L & Curriel DT.** Cellular Vehicles for Cancer Gene Therapy. Current Status and Future Potential. *BioDrugs* 2004; **18**: 361-385.

**Petersen TN, Brunak S, Heijne G, Nielsen H.** SignalP 4.0: Discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods* 2011; **8**: 785-786.

**Posey JA, Khazaeli MB, Bookman MA, Nowrouzi A, Grizzle WE, Thornton J, Carey DE, Lorenz JM, Sing AP, Siegall CB, LoBuglio AF, Saleh MN.** A Phase I Trial of the Single-Chain Immunotoxin SGN-10 (BR96 sFv-PE40) in Patients with Advanced Solid Tumors. *Clin Canc Res* 2002; **8**: 3092-3099.

**Prinz EM, Eggers R, Lee HH, Steinfeld U, Hempelmann R.** Synthesis of drug loaded nanoparticles and their uptake into immune cells. *JPCS* 2010; **200**: 122009.

**Reiter Y, Brinkmann U, Jung SH, Lee B, Kasprzyk PG, King CR, Pastan I.** Improved Binding and Antitumor Activity of a Recombinant Anti-erbB2 Immunotoxin by Disulfide Stabilization of the Fv Fragment. *J Biol Chem* 1994; **269**: 18327-18331.

**Reiter Y, Haus-Cohen M.** 2009. *Anti human immunodeficient antibodies and uses thereof*. WO 2009/125394.

**Robinson CJ & Stringer SE.** The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci* 2001; **114**: 853-865.

**Ross JS, Slodkowska EA, Symmans WF, Pusztai L, Ravdin PM, Hortobagyi GN.** The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. *The Oncologist* 2009; **14**: 320-368.

**Ruf P, Gires O, Fellingner K, Atz J, Lindhofer H.** Characterisation of a new EpCAM-specific antibody HO-3: implications for trifunctional antibody immunotherapy of cancer. *Br J Canc* 2007; **97**: 315-321.

**Safari E, Hosseini AZ, Hassan Z, Khajeh K, Ardestani MS, Baradaran B.** Cytotoxic effect of Immunotoxin containing the truncated form of Pseudomonas Exotoxin A and anti-VEGFR on HUVEC and MCF-7 cell lines. *Cell J* 2014; **16**: 203-210.

**Schaft N, Dörrie J, Müller I, Beck V, Baumann S, Schunder T, Kämpgen E, Schuler G.** A new way to generate cytolytic tumor-specific T cells: electroporation of RNA coding for a T cell receptor into T lymphocytes. *Cancer Immunol Immunother* 2006; **55**: 1132-1141.

**Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW.** NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 2012; **9**: 671.

**Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ.** Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science* 2011; **331**: 1565-1570.

**Scott AM, Wolchok JD, Old LJ.** Antibody therapy of cancer. *Nature* 2012; **12**: 278.

**Shahneh FZ, Baradaran B, Zamani F, Aghebati-Maleki L.** Tumor angiogenesis and anti-angiogenic therapies. *Hum Antibodies* 2013; **22**: 15-19.

**Shevchenko A, Wilm, M, Vorm O, Mann M.** Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 1996; **68**: 850-858.

**Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y.** Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea. *J Cell Physiol* 1962; **59**: 223-239.

**Siegall CB, Ogata M, Pastan I, Fitzgerald DJ.** Analysis of sequences in domain II of Pseudomonas exotoxin A which mediate translocation. *Biochem* 1991; **30**: 7154-7159.

Signal Peptid Database: <http://www.signalpeptide.de>

**Smith DC, Spooner RA, Watson PD, Murray JL, Hodge TW, Amessou M, Johannes L, Lord JM, Roberts M.** *Traffic* 2006. **7**: 379-393.

**Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS.** T Cell Activation. *Annu Rev Immunol* 2009. **27**: 591-619.

**Smits E, Ponsaerts P, Lenjou M, Nijs G, Van Bockstaele DR, Berneman ZN, Van Tendeloo VFI.** RNA-based gene transfer for adult stem cells and T cells. *Leukemia* 2004; **18**: 1898-1902.

**Spizzo G, Obrist P, Ensinger C, Theurl I, Dünser M, Ramoni A, Gunsilius E, Eibl G, Mikuz G, Gastl G.** Prognostic significance of Ep-CAM and Her-2/neu overexpression in invasive breast cancer. *Int J Cancer* 2002; **98**: 883-888.

**Srivastava S & Riddell SR.** Engineering CAR-T Cells: Design Concepts. *Trends Immunol* 2015; **36**: 494-502.

**Strauß G, Gückel B, Wallwiener D, Moldenhauer G.** Without Prior Stimulation, Tumor-associated Lymphocytes from Malignant Effusions Lyse Autologous Tumor Cells in the Presence of Bispecific Antibody HEA125xOKT3. *Clin Cancer Res* 1999; **5**: 171-180.

**Topp MS, Kufer P, Gökbuget N, Goebeler M, Klinger M, Neumann S, Horst HA, Viardot A, Schmid M, Stelljes M.** Targeted therapy with the T-cell-engaging antibody blinatumomab or chemotherapy-refractory minimal residual disease in B-lineage acute lymphoblastic leukemia patients results in high response rate and prolongs leukemia-free survival. *J Clin Oncol* 2011; **29**: 2493-2498.

**Vallera DA, Jin N, Baldrice JMR, Panoskaltsis-Mortari A, Chen SY, Blazar BR.** Retroviral Immunotoxin Gene Therapy of Acute Myelogenous Leukemia in Mice Using Cytotoxic T Cells Transduced with Interleukin 4/Diphtheria Toxin Gene. *Canc Res* 2000; **60**: 976-984.

**Verma S, Miles D, Gianni L, Krop IE, Welslau M, Baselga J, Pegram M, Oh DY, Diéras V, Guardino E, Fang L, Lu MW, Olsen S, Blackwell K.** Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer. *New Engl J Med* 2012; **367**: 1783-1791.

**Verri E, Guglielmini P, Putoni M, Perdelli L, Papadia A, Rubagotti A, Ragni N, Boccardo F.** Her2/neu Oncoprotein Overexpression in Epithelial Ovarian Cancer: Evaluation of its Prevalence and Prognostic Significance. *Oncology* 2005; **68**: 154-161.

**Vignali D & Kallikourdis M.** Improving homing in T cell therapy. *Cytokine Growth F R* 2017; **36**: 107-116.

**Wang K, Guoqing W, DeLong L.** CD19: a biomarker for B cell development, lymphoma diagnosis and therapy. *Exp Hematol Oncol* 2012; **1**: 36.

**Weigelin B, Krause M, Friedl P.** Cytotoxic T lymphocyte migration and effector function in the tumor microenvironment. *Immunol Lett* 2011; **138**: 19-21.

**Weldon JE & Pastan I.** A guide to taming a toxin - recombinant immunotoxins constructed from *Pseudomonas* exotoxin A for the treatment of cancer. *FEBS* 2011; **278**: 4683-4700.

WMA Deklaration von Helsinki - Ethische Grundsätze für die medizinische Forschung am Menschen. Verabschiedet im Juni 1964, Helsinki (Finnland), revidiert im Oktober 2013, Fortaleza (Brasilien).

**Wolf P & Elsässer-Beile U.** Pseudomonas exotoxin A: From virulence factor to anti-cancer agent. *Int J Med Microbiol* 2009; **299**: 161-176.

**Yang Y.** Cancer Immunotherapy: harnessing the immune system to battle cancer. *J Clin Invest* 2015. **125**: 3335-3337.

**Youniss FM, Sundaresan G, Graham LJ, Wang L, Berry CR, Dewkar GK, Jose P, Bear HD, Zweit J.** Near-Infrared Imaging of Adoptive Immune Cell Therapy in Breast Cancer Model Using Cell Membrane Labeling. *PLOS* 2014; **9**: e109162.

**Zhao Y, Zheng Z, Cohen CJ, Gattinoni L, Palmer DC, Restifo NP, Rosenberg SA, Morgan RA.** High-efficiency transfection of primary human and mouse T lymphocytes using RNA electroporation. *Mol Ther* 2006; **13**: 151-159.

**Zhao Y, Su H, Yin G, Liu X, Liu Z, Suo X.** High transfection efficiency of porcine peripheral blood T cells via nucleofection. *Vet Immunol Immunopat* 2011; **144**: 179-186.

## 7 Veröffentlichungen

Im Rahmen der vorliegende Arbeit sind folgende Veröffentlichungen erschienen:

### Publikation:

**Eggers R, Philippi A, Altmeyer MO, Breinig F, Schmitt MJ.** Primary T cells for mRNA-mediated immunotoxin delivery. *Gene Therapy* 2018; **25**: 47-53.

### Konferenz-Poster:

**Eggers R, Philippi A, Altmeyer MO, Breinig F, Schmitt MJ.** Use of primary T cells for delivery of mRNA encoded immunotoxins. European Congress of Immunology, Amsterdam, Netherlands 2018.

**Eggers R, Philippi A, Breinig F, Schmitt MJ.** Expression of PE38-based immunotoxins in T cells introduced by mRNA transfection. 13th Cancer Immunotherapy Meeting, Mainz 2015.

**Eggers R, Philippi A.** Primary T cells, transiently transfected with mRNA, express Immunotoxins *in vitro*. 44th Annual Meeting German Society for Immunology, Bonn 2014.

**Eggers R, Philippi A.** Establishment of an effective transient transfection method for preparation of therapeutics expressing T lymphocytes. 10th Cancer Immunotherapy Meeting, Mainz 2012.

## 8 Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Herrn Professor Manfred J. Schmitt für die Betreuung meiner Doktorarbeit und die Unterstützung bei der Publikation bedanken. Bei Dr. Frank Breinig möchte ich mich ebenfalls für die Hilfe bei der Dissertation und Publikation bedanken.

Bei Herrn Professor Markus Hoth bedanke ich mich, dass er sich als Zweitprüfer zur Verfügung stellt.

Beim KIST Europe möchte ich mich für die finanzielle Unterstützung und die Bereitstellung der Labore bedanken.

Bei Dr. Anja Philippi bedanke ich mich, dass sie mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Doktorarbeit zu machen und für die Planung des Projekts.

Bei Dr. Nuriye Korkmaz-Zirpel bedanke ich mich ganz herzlich für die Motivation und für die wissenschaftliche Unterstützung und Diskussionen.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen KIST Europe Mitgliedern, vor allem bei Dr. Michelle Seif und Dr. Bianca Schweiger für die freundliche Atmosphäre im Büro und wissenschaftliche Diskussionen, bei Dr. Matthias Altenberger für die Hilfe bei der MS-Messung und bei Daniela Vanni-Strassner für organisatorische Hilfe.