

**Hochschule für Angewandte Wissenschaften**

**Fakultät Life Sciences**

Herstellung und Charakterisierung von Einzeldomänenantikörpern und  
Nanopartikelkonjugaten für die Visualisierung von Tumorzellen

Master Thesis

im Studiengang Pharmaceutical Biotechnology

vorgelegt von

**Stefanie Witocy**

**2053009**

Hamburg

07.12.2012

Gutachter: Prof. Dr. Birger Anspach (HAW Hamburg)

Gutachter: Dr. Holger Stephan (HZDR)

Die Abschlussarbeit wurde betreut und erstellt in Zusammenarbeit mit dem Institut  
Radiopharmazie des Helmholtz-Zentrums Dresden-Rossendorf.

## Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Jörg Steinbach und Herrn Dr. Holger Stephan bedanken, die mir die Möglichkeit gaben, meine Master Thesis in der Arbeitsgruppe „Nanoskalige Systeme“ am Institut für Radiopharmazie des Helmholtz-Zentrums Dresden-Rossendorf anzufertigen. Vor allem danke ich Herrn Dr. Stephan dafür, dass er das Zweitgutachten meiner Arbeit übernommen hat und für Fragen und Probleme stets ein offenes Ohr hatte. In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Birger Anspach für die Betreuung seitens der Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg bedanken.

Ein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. Kristof Zarschler, der mich mit seiner fachlich kompetenten und freundlichen Betreuung bis zum Ende meiner Arbeit unterstützt hat. Ich danke ihm für seine Diskussionsbereitschaft, die mich während der Anfertigung meiner Master Thesis stets motivierte.

Ein großer Dank geht auch an Herrn Dr. Christian Förster für seine Unterstützung bei der Radiomarkierung, sowie an Herrn Maik Schubert für die Bereitstellung diverser Chemikalien und Laborgeräte. Ich danke beiden für die sehr angenehme Zusammenarbeit.

Weiterhin bedanke ich mich bei Frau Manja Kubeil und Frau Karin Landrock für die harmonische Atmosphäre im Büro.

Des Weiteren bedanke ich mich bei der gesamten Abteilung, die mich so nett in ihren Kreis aufgenommen hat.

Mein allergrößter Dank jedoch gebührt nicht zuletzt meiner lieben Familie, die mich während meiner gesamten Studienzeit unterstützt hat. Dank ihnen bin ich so, wie ich bin.

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
Abkürzungsverzeichnis .....	6
Abbildungsverzeichnis .....	8
Tabellenverzeichnis .....	9
1 Zusammenfassung / Abstract .....	10
2 Einleitung .....	12
2.1 Hintergrund.....	12
2.2 Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) als eine Zielstruktur in der Onkologie.....	13
2.3 EGFR-Targeting in der Tumorthherapie und -diagnostik .....	15
2.3.1 Monoklonale Antikörper .....	15
2.3.2 F(ab') <sub>2</sub> -, Fab- und scFv-Fragmente .....	17
2.3.3 Schwere-Ketten-Antikörper und Einzeldomänenantikörper .....	18
2.4 Zielsetzung dieser Arbeit.....	20
3 Material und Methoden .....	21
3.1 Materialien .....	21
3.1.1 Bakterienstämme und humane Zelllinien.....	21
3.1.2 Medium .....	21
3.1.3 Materialien für die Zellkultur .....	22
3.1.4 Materialien für die Generierung von Einzeldomänenantikörpern.....	24
3.1.5 Materialien für die SDS-PAGE und den Western Blot .....	25
3.1.6 Materialien für die radioaktive Markierung .....	27
3.1.7 Materialien für die Nanopartikel-Konjugation .....	27
3.1.8 Puffer und Lösungen.....	28
3.1.9 Software.....	31
3.2 Zellkulturarbeiten .....	31

3.2.1 <i>In-vitro</i> -Kultivierung humaner Zelllinien.....	31
3.2.2 Zellzahlbestimmung.....	33
3.3 Biochemische Methoden.....	33
3.3.1 Proteinbestimmung.....	33
3.3.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	33
3.3.3 Western Blot .....	34
3.3.4 Dot-Blot.....	35
3.3.5 Nachweis von Disulfidbrücken.....	35
3.3.6 Quantitative Bestimmung von freien Aminogruppen.....	36
3.3.7 Acetonfällung von Proteinen.....	37
3.4 Molekularbiologische Methoden.....	37
3.4.1 Synthese der kodierenden Sequenzen der Einzeldomänenantikörper.....	37
3.4.2 Transformation, Plasmid-Isolierung und DNA-Sequenzierung.....	38
3.4.4 Restriktionsverdau von DNA.....	38
3.4.5 Agarosegelelektrophorese.....	38
3.4.6 DNA-Reinigung und -Extraktion aus Agarosegelen.....	39
3.4.7 Ligation von DNA.....	39
3.4.8 Kolonie-PCR.....	40
3.5 Präparative Methoden.....	41
3.5.1 Kultivierung von <i>E. coli</i> SHuffle® T7 Express.....	41
3.5.2 Reinigung von Einzeldomänenantikörpern.....	41
3.5.3 Dialyse und Aufkonzentrierung.....	42
3.5.4 Konjugation von Einzeldomänenantikörpern an Nanopartikel.....	42
3.6 Spektroskopische Methoden.....	44
3.6.1 UV-VIS-Spektroskopie.....	44
3.6.2 Dynamische Lichtstreuung und Zetapotential.....	45
3.7 Radiomarkierung von Einzeldomänenantikörpern.....	45
3.8 <i>In-vitro</i> -Untersuchungen zur Zellbindung und Zellaufnahme.....	46

3.8.1 Zell-ELISA.....	46
3.8.2 Assay zur Zellaufnahme .....	47
3.9 Immunfluoreszenz .....	48
4 Ergebnisse und Diskussion.....	49
4.1 Herstellung von Einzeldomänenantikörpern.....	50
4.1.1 Periplasmatische Expression.....	51
4.1.2 Zytoplasmatische Expression .....	54
4.2 Charakterisierung der Einzeldomänenantikörper .....	55
4.3 Radiomarkierung der Einzeldomänenantikörper .....	60
4.4 Charakterisierung der Nanopartikelkonjugate .....	62
4.5 Untersuchung der EGFR-Bindungseigenschaften der Einzeldomänenantikörper und Nanopartikelkonjugate .....	65
4.5.1 Untersuchung der Bindungsfähigkeiten der Einzeldomänenantikörper mit Hilfe von <i>In-vitro</i> -Bindungsassays.....	65
4.5.2 Untersuchung der Bindungsfähigkeiten der Einzeldomänenantikörper und Nanopartikelkonjugate mittels Immunfluoreszenz .....	72
Literaturverzeichnis .....	77
Selbständigkeitserklärung.....	85

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
%	Prozent
A	dekadisches Absorptionsmaß (Absorbanz)
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Bovine Serum Albumin
C225	Erbitux <sup>®</sup> , Cetuximab
C <sub>L</sub> / C <sub>H</sub>	konstante Region der leichten Kette / schweren Kette
d	Tage
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
DTNBx2	Ellmann's Reagenz
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF / EGFR	epidermaler Wachstumsfaktor / epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
FKS	Fötale Kälberserum
h	Stunden
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HNSCC	Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs
IMAC	<i>Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
l	Liter
M	Molar
mA	Milliampere
mAk	monoklonaler Antikörper
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
mg	Milligramm
min	Minute

µl	Mikroliter
ml	Milliliter
MW	Molekularmasse
MWCO	<i>Molecular Weight Cut Off</i>
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
PBS	Phosphate Buffer Saline
PDI	Polydispersitätsindex
PMMA	Polymethylmethacrylat
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
sdAb	Einzeldomänenantikörper
SDS	Sodiumdodecylsulfate
Sulfo-NHS	Sulfo-N-Hydroxysuccinimid
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TcO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	Pertechnetat
[ <sup>99m</sup> Tc(H <sub>2</sub> O) <sub>3</sub> (CO) <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	Triaqua-tricarbonyl- <sup>99m</sup> Tc-Kation
TEMED	Tetramethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzensulfonsäure
ÜN	über Nacht
V <sub>L</sub> / V <sub>H</sub>	variable Region der leichten Kette / schweren Kette

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aktivierung des EGFR.....	14
Abbildung 2: Struktur eines IgG-Antikörpers.....	16
Abbildung 3: Strukturen verschiedener IgG-Fragmente.....	18
Abbildung 4: Struktur der hcAb und sdAb .....	19
Abbildung 5: Reaktionsgleichung freier Aminogruppen mit TNBS.....	36
Abbildung 6: Schema zur Nanopartikelkonjugation .....	43
Abbildung 7: Nachweis der periplasmatischen und zytoplasmatischen Expression der sdAb mittels Western Blot .....	51
Abbildung 8: Überprüfung der Zugänglichkeit des Affinitäts-Tags mittels Dot-Blot.....	52
Abbildung 9: Bestätigung der Unzugänglichkeit des poly-Histidin-Peptids .....	53
Abbildung 10: Kontrolle der Reinigung des 7C12 mittels Western Blot .....	54
Abbildung 11: Experimentelle Bestimmung der Extinktionskoeffizienten der sdAb .....	58
Abbildung 12: Quantitative Bestimmung freier Aminogruppen .....	59
Abbildung 13: Radio-HPLC des <sup>99m</sup> Tc-EG2 .....	61
Abbildung 14: SDS-PAGE zur Überprüfung der Stabilität des EG2 während der Radiomarkierung.....	62
Abbildung 15: PMMA-Nanopartikelgrößenverteilung.....	63
Abbildung 16: Zell-ELISA mit EG2 .....	66
Abbildung 17: Zell-ELISA mit 7C12.....	66
Abbildung 18: Zellbindung von <sup>99m</sup> Tc-7C12 an vitale Zellen .....	68
Abbildung 19: Zellbindung von <sup>99m</sup> Tc-EG2 an vitale Zellen.....	69
Abbildung 20: Untersuchungen zur spezifischen Bindung des sdAb 7C12 .....	70
Abbildung 21: Untersuchungen zur spezifischen Bindung des sdAb EG2.....	71
Abbildung 22: Immunfluoreszenzfärbung 7C12-behandelter A431-Zellen .....	73
Abbildung 23: Immunfluoreszenzfärbung EG2-behandelter A431-Zellen.....	74
Abbildung 24: Immunfluoreszenzfärbung EG2-NP-Konjugat behandelte A431-Zellen	75



## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Materialien für die Zellkultur .....	22
Tabelle 2: Materialien für die Generierung von Einzeldomänenantikörpern .....	24
Tabelle 3: Materialien für die SDS-PAGE und den Western Blot.....	25
Tabelle 4: Materialien für die radioaktive Markierung .....	27
Tabelle 5: Materialien für die Nanopartikel-Konjugation .....	27
Tabelle 6: Pipettierschema für die Kolonie-PCR.....	40
Tabelle 7: Parameter für die Kolonie-PCR.....	40
Tabelle 8: Bestimmung der Ausbildung von Disulfidbrücken in sdAb .....	57
Tabelle 9: DLS Analyse unmodifizierter und mit sdAb beschichteter PMMA- Nanopartikel (NP) in PBS (pH 7,4) bei 25 °C .....	64

## 1 Zusammenfassung / Abstract

Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR), welcher in vielen humanen Tumoren epithelialen Ursprungs überexprimiert ist, repräsentiert einen der wichtigsten Biomarker, die im Zusammenhang mit Krebserkrankungen bekannt sind. Die Identifizierung solcher Tumor-assoziierten Moleküle erfolgt dabei immer mehr auf Grundlage nicht-invasiver Bildgebungsverfahren, wie zum Beispiel der Positronen-Emissions-Computertomographie (PET) und der Einzelphotonen-Emissions-Computertomographie (SPECT). Hierbei kommen derzeit vorrangig monoklonale Antikörper (mAk) zum Einsatz, die jedoch aufgrund ihrer Molekularmasse eine eher langsame Pharmakokinetik aufweisen. Mit Einzeldomänenantikörpern (sdAb) hingegen können hohe Tumor-zu-Hintergrund-Verhältnisse bereits kurze Zeit nach der Injektion erzielt werden, sodass diese immer mehr in den Fokus neuer Imaging-Strategien rücken. Um den zukünftigen Einsatz der zwei in der Literatur beschriebenen anti-EGFR sdAb EG2 und 7C12 für die multimodale Bildgebung untersuchen zu können, wurden diese im Zytoplasma des *E.coli* SHuffle® T7 Express heterolog exprimiert und mittels immobilisierter Metallchelate-Affinitätschromatographie gereinigt. Die Ausbeuten beider sdAb pro Liter Kulturmedium betragen 25,0 mg EG2 und 4,2 mg 7C12. Zur näheren Charakterisierung der sdAb wurde die korrekte Ausbildung der in den Proteinen enthaltenen Disulfidbrücken untersucht und jeweils die Extinktionskoeffizienten und der Gehalt freier Aminogruppen bestimmt. Für erste Zellbindungsassays wurden die sdAb mit <sup>99m</sup>Tc und einer radiochemischen Reinheit von über 90 % markiert. Weiterhin wurde gezeigt, dass beide sdAb abhängig vom Expressionslevel des EGFR der verwendeten humanen Krebszelllinien an A431- und FaDu-Zellen binden. Pro A431-Zelle haben bis zu 0,017 fmol 7C12 bzw. 0,005 fmol EG2 gebunden, je FaDu-Zelle bis zu 0,012 fmol 7C12 bzw. 0,002 fmol EG2. Die sdAb wurden an die Oberfläche fluoreszenter PMMA-Nanopartikel (NP) gebunden und die Konjugate anschließend im Vergleich zu den ungebundenen sdAb hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften mittels Immunfluoreszenzfärbung untersucht. 7C12 wurde hauptsächlich membranständig detektiert und zeigte dementsprechend eine Co-Lokalisation mit EGFR. EG2 hingegen wurde intrazellulär in der Nähe des Zellkerns lokalisiert. Erste *In-vitro*-Untersuchungen zur Bindung der EG2-NP-Konjugate zeigten ebenfalls eine Lokalisation nahe dem Zellkern. Weitere Bindungsstudien mittels konfokaler Mikroskopie und Durchflusszytometrie, vor allem die Untersuchungen der 7C12-NP-Konjugate sind in Planung.

The epidermal growth factor receptor (EGFR), which is overexpressed in a variety of human tumors of epithelial origin, is one of the most important biomarker known in the context of cancer. To identify such tumor-associated molecules noninvasive imaging procedures, e.g. positron emission tomography (PET) and single photon emission computed tomography (SPECT), are of high interest, whereby monoclonal antibodies (mAb) are widely used. However, their large size (150 kDa) leads to liver accumulation and prevents rapid blood clearance. The usage of single-domain antibodies (sdAb) can help to overcome these drawbacks. Because of their smaller size it is possible to achieve high tumor-to-background ratios a short time after injection. To evaluate the application of two anti-EGFR sdAb in multimodal imaging, the sdAb EG2 and 7C12 were expressed heterologously in the cytoplasm of *E.coli* SHuffle® T7 Express. The yields of 7C12 and EG2 purified by immobilized metal affinity chromatography (IMAC) were 4.2 mg and 25.0 mg per liter medium, respectively. The validation of correct folded disulfide bonds and the determination of extinction coefficients and content of free amino groups were performed for further characterization. For the examination of binding features sdAb were radiolabeled with <sup>99m</sup>Tc with a radiochemical purity of at least 90 %. Both sdAb bound to A431 and FaDu cells depending on their EGFR expression level. One single A431 cell bound up to 0.017 fmol 7C12 or 0.005 fmol EG2, respectively, and one single FaDu cell bound up to 0.012 fmol 7C12 or 0.002 fmol EG2, respectively. The two sdAb were bound to the surface of PMMA nanoparticles (NP) and they were analyzed concerning their binding features. For this purpose immunofluorescent staining was performed to compare sdAb with sdAb-NP-conjugates. Membrane localization associated with co-localization with EGFR was shown in the case of 7C12. However, EG2 was found to be localized close to the nucleus of the cells. This was also true for EG2-NP-conjugates. Additional studies of binding by confocal microscopy and flow cytometry, especially the investigation of 7C12-NP-conjugates, remains to be done.

## 2 Einleitung

### 2.1 Hintergrund

Neben Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems zählt Krebs zu den häufigsten Todesursachen in den Industrienationen. Dabei waren dem deutschen statistischen Bundesamt zufolge maligne Tumore Auslöser für ein Viertel aller Todesfälle im Jahr 2010. Wissenschaftler des Zentrums für Krebsregisterdaten des Robert-Koch-Instituts erwarten zudem für das Jahr 2012 rund 486.000 neue Krebserkrankungen. Aufgrund der zunehmenden Lebenserwartung ist auch weiterhin mit einem Anstieg zu rechnen [1, 2]. Vor diesem Hintergrund wird in der Krebsforschung stets nach neuen tumorspezifischen Therapiestrategien und optimierten molekularen Bildgebungsverfahren gesucht, wobei die genaue Lokalisierung des Tumors beispielsweise mittels Positronen-Emissions-Computertomographie (PET) und Einzelphotonen-Emissions-Computertomographie (SPECT) erfolgt. Hierbei wird dem Patienten vor der Untersuchung ein Radiopharmakon intravenös verabreicht, welches an eine bestimmte Zielstruktur im Körper bindet. Die verwendeten Radionuklide, wie zum Beispiel  $^{18}\text{F}$  ( $t_{1/2} = 109,7 \text{ min}$ ),  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  ( $t_{1/2} = 6 \text{ h}$ ) oder  $^{64}\text{Cu}$  ( $t_{1/2} = 12,7 \text{ h}$ ), emittieren Positronen bzw. Gammastrahlung, die von Detektoren registriert werden und deren Informationen mit Hilfe eines Computers in der Erstellung von Schnittbildern resultiert [3, 4]. Therapieansätze und bildgebende Verfahren basieren hauptsächlich auf den unterschiedlichen Expressionsprofilen normaler und maligner Zellen, sodass Zielstrukturen, die vorrangig durch Tumorzellen präsentiert werden, indessen eine der wichtigsten Voraussetzungen für eine tumorspezifische Anreicherung der Radiopharmaka bilden [5]. Zu den bekanntesten Vertretern dieser Targets gehören Zelloberflächenrezeptoren, wie zum Beispiel der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (*epidermal growth factor receptor*, EGFR, ErbB-1), dessen Bedeutung bereits in klinischen Studien demonstriert werden konnte [5, 6].

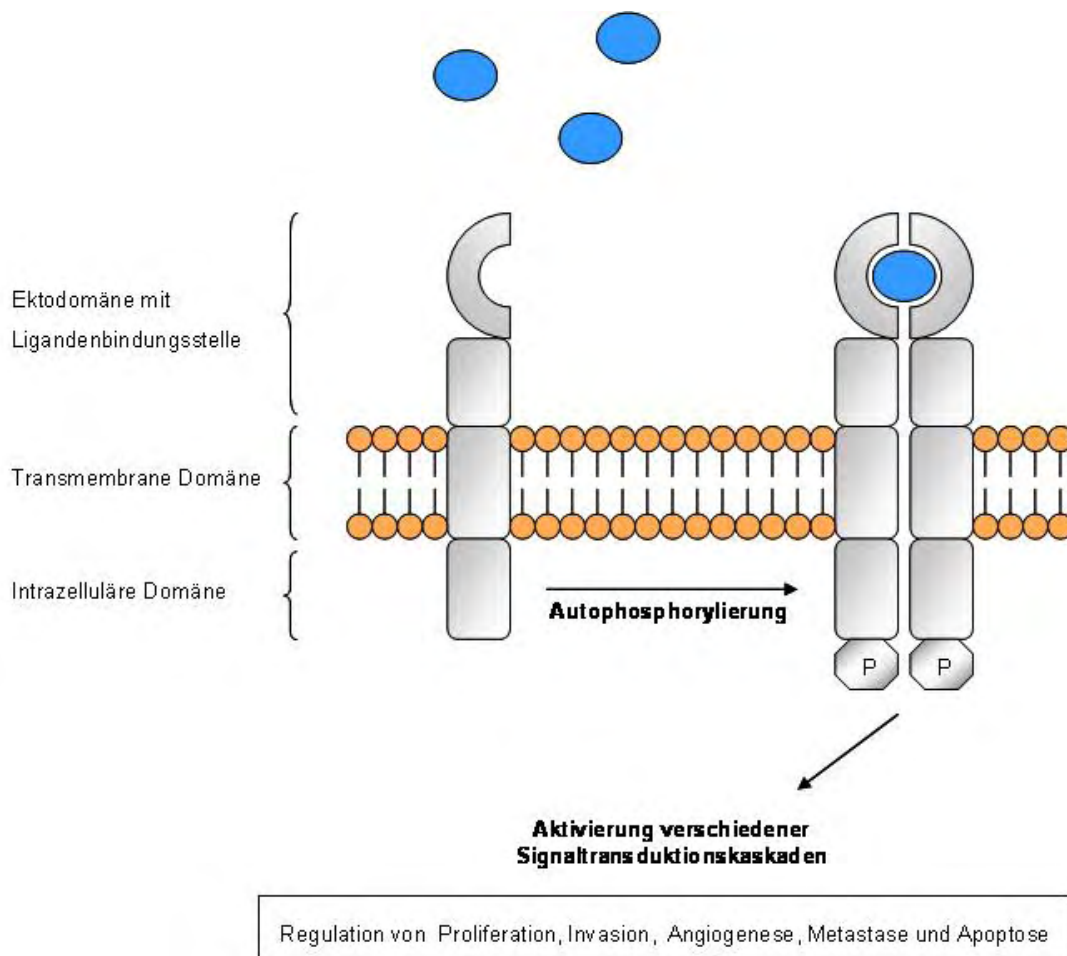
## 2.2 Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) als eine Zielstruktur in der Onkologie

Die epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren (*epidermal growth factor receptor*, EGFR, ErbB-1), ErbB-2, ErbB-3 und ErbB-4 bilden zusammen die Familie der Rezeptor-Tyrosinkinassen. Diese vier Rezeptoren haben einen homologen Aufbau, welcher durch eine extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne, einen transmembranen Bereich und eine intrazelluläre Tyrosinkinasedomäne gekennzeichnet ist. Beim EGFR handelt es sich um ein Glykoprotein mit einer Molekularmasse von 170 kDa. Der Rezeptor übernimmt eine zentrale Rolle in der Signaltransduktion und damit in der Regulierung der Zelldifferenzierung, im Zellwachstum und Zellüberleben gesunder und maligner Zellen [7].

Die Aktivierung des EGF-Rezeptors, welcher zunächst als Monomer vorliegt, erfolgt unter normalen physiologischen Bedingungen streng reguliert (Abbildung 1). Dies wird durch eine temporäre und lokale Expression natürlicher Liganden, wie zum Beispiel dem epidermalen Wachstumsfaktor (*epidermal growth factor*, EGF) sowie dem transformierenden Wachstumsfaktor (*transforming growth factor*, TGF- $\alpha$ ) erzielt [8]. Die spezifische Bindung der Liganden an die Ektodomäne des Rezeptors resultiert entweder in der Heterodimerisierung mit einem anderen Vertreter der Rezeptorfamilie oder in der Homodimerisierung zweier EGFR. In beiden Fällen erfolgt die Autophosphorylierung der Tyrosinkinasedomäne, sodass verschiedene intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden aktiviert werden. Zu diesen zählen unter anderem der Ras-Raf-MAP-Kinase-, der JAK/STAT- und der PI3K-Akt-Signalweg, welche Einfluss auf die Proliferation, Invasion und Apoptose der Zelle haben [9-11].

Punktmutationen oder ein durch Überexpression gesteigerter EGF-Rezeptorbesatz führen in vielen menschlichen Tumorentitäten zu einer abnormalen Aktivierung des Rezeptors, so zum Beispiel in über 90 % aller Tumore des Kopf-Hals-Bereichs (*head and neck squamous cell carcinoma*, HNSCC) [12]. Die zentrale Rolle des EGFR in der Onkogenese steht einerseits im Zusammenhang mit der Entwicklung von Strahlenresistenzen und einer damit verbundenen schlechten klinischen Prognose, andererseits liefert sie Ansatzpunkte für Therapie- und Diagnostikstrategien [13-15].

Diese basieren hauptsächlich auf der Anwendung zweier Substanzklassen, den Tyrosinkinase-Inhibitoren und den anti-EGFR Antikörpern. In einer randomisierten klinischen Studie konnte bereits gezeigt werden, dass durch eine kombinierte Anwendung von Radiotherapie und dem anti-EGFR Antikörper Erbitux® (Cetuximab, C225, ImClone System Inc.) die Tumorheilung und das Gesamtüberleben bei HNSCC-Patienten im Vergleich zur alleinigen Strahlentherapie positiv beeinflusst werden kann [6].



**Abbildung 1: Aktivierung des EGFR**

Der EGFR besteht aus einer extrazellulären Domäne mit Ligandenbindungsstelle, einer transmembranen und intrazellulären Domäne mit Tyrosinkinase-Aktivität. Die Bindung von Liganden, wie zum Beispiel EGF und TGF- $\alpha$ , führt zur Dimerisierung des Rezeptors und zur Autophosphorylierung. Dies resultiert in der Aktivierung verschiedener Downstream-Signale, die unter anderem die Regulierung der Proliferation und Apoptose der Zelle zur Folge hat.

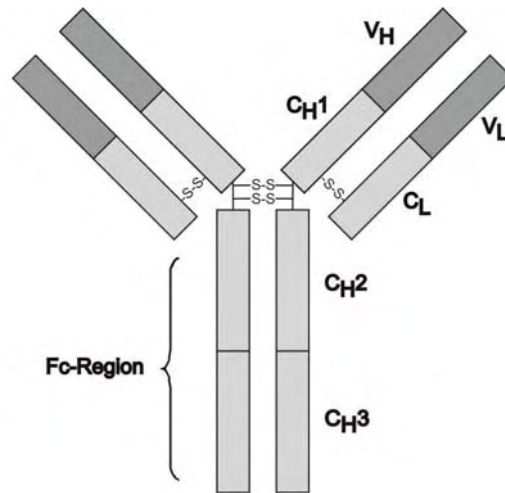
## 2.3 EGFR-Targeting in der Tumorthherapie und -diagnostik

Die klassischen Strategien der Krebstherapie umfassen die Chirurgie, die Chemotherapie und die Strahlentherapie, wobei die kurative Behandlung der Tumore in Verbindung mit der Unterbindung der Metastasierung im Mittelpunkt dieser Therapieformen steht [16]. Trotz der vielfältigen Therapiestrategien nehmen die Heilungschancen bei spät diagnostizierten Tumoren ab. Während Patienten, die beispielsweise an einem Tumor des Kopf-Hals-Bereichs leiden und dieser im frühen Stadium (I/II) entdeckt wird, eine gute Prognose haben, sinkt bei Patienten mit Tumoren im fortgeschrittenen Stadium (III/IV) die Heilungsrate nach fünf Jahren auf 30 - 50 % [17]. Um die Heilungschancen zu verbessern, sind neben einer frühzeitigen Diagnostizierung optimierte tumorspezifische Therapien enorm wichtig. Eine Möglichkeit dies zu erreichen, bietet das Molekulare Targeting. Hierbei wird unter anderem mit monoklonalen Antikörpern (mAk) spezifisch in tumortypische Signaltransduktionskaskaden eingegriffen und damit die Regulationsmechanismen für Invasion und Proliferation der Tumorzelle gestört [18, 19].

### 2.3.1 Monoklonale Antikörper

Monoklonale Antikörper (mAk) des Typs IgG bestehen aus je zwei identischen leichten (*light*, L) und schweren Ketten (*heavy chain*, H), die durch kovalente Disulfidbrücken und nicht-kovalente Wechselwirkungen miteinander verbunden sind (Abbildung 2). Jede der Ketten verfügt zudem sowohl über konstante (C) als auch variable (V) Bereiche, wobei letztere zusätzlich drei hypervariable Regionen (*complementary determining region*, CDR) aufweisen. Die variablen Regionen beider Ketten bilden gemeinsam die Antigenbindungsstelle. Unterhalb der Gelenkregion ist die konstante Fc-Region lokalisiert, die zelluläre Reaktionen, wie zum Beispiel die Antikörpervermittelte Zellzytotoxizität (ADCC), auslösen kann [7]. Erste Anwendungen fanden murine mAk in den 1980er [20]. Diese führten jedoch aufgrund des körperfremden

Proteins zu unerwünschten anti-Maus-Immunreaktionen im Menschen. Um die klinische Effektivität weiter zu verstärken, wurden mAk mit Hilfe molekularbiologischer Modifikationen zunächst chimärisiert und nachfolgend weitgehend humanisiert [21].



**Abbildung 2: Struktur eines IgG-Antikörpers**

Immunglobuline G bestehen typischerweise aus zwei identischen leichten (L) und schweren (H) Ketten, die jeweils konstante (C) und variable Domänen enthalten. Die variablen Bereiche der beiden Ketten bilden gemeinsam die Antigenbindungsstelle. Unterhalb der Gelenkregion befindet sich die konstante Fc-Region, die zelluläre Immunreaktionen hervorrufen kann.

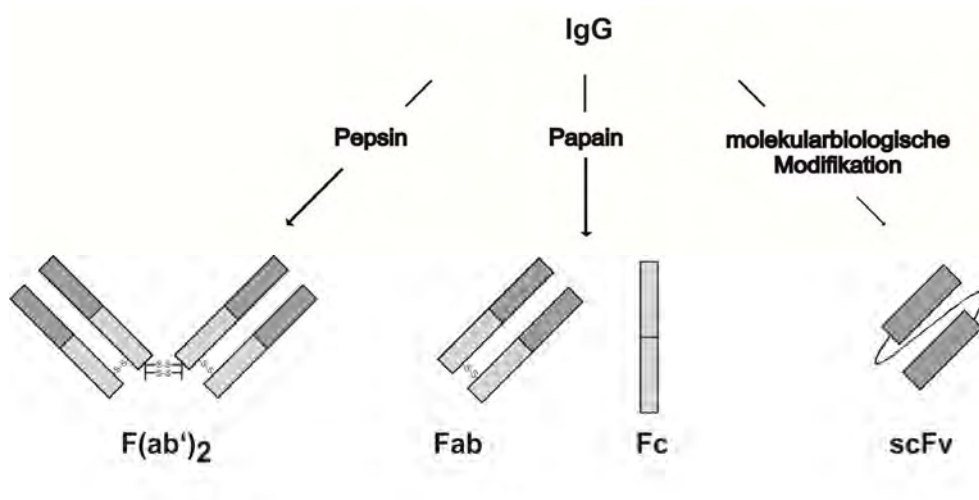
Erbitux<sup>®</sup>, welcher 2004 von der *Food and Drug Administration* (FDA) für die Behandlung von Darmkrebs mit überexprimiertem EGFR zugelassen wurde, ist einer der bekanntesten Vertreter chimärer mAk [22, 23]. Hierbei sind die Antigenbindungsstellen murinen und die konstanten Bereiche humanen Ursprungs. Obwohl der murine Anteil des Antikörpers recht gering ist, kann dieser durch das humane Immunsystem weiterhin als Fremdprotein identifiziert werden und ebenfalls zu Abwehrreaktionen führen, die eine repetitive Applikation unmöglich machen. Um unerwünschte Nebenwirkungen zu unterbinden, wurden zusätzlich humanisierte und humane Antikörper für die Anwendung im Patienten etabliert [24]. Trotz dieser Erfolge zeigen mAk vor allem im Bereich der Radioimmundiagnostik einige Nachteile. Die Molekularmasse intakter IgG von rund 150 kDa führt zum einen zur Akkumulation in der Leber und zum anderen zu langen Serumhalbwertszeiten von bis zu 23 Tagen



[25]. Letzteres ist vorrangig bei therapeutischen Anwendungen von Vorteil, bei denen Signalwege inhibiert oder Immunreaktionen in Form einer ADCC ausgelöst werden sollen. Dient der zu applizierende mAk jedoch als Träger von Radionukliden, ist eine schnelle Blut-Clearance und kurze Serumhalbwertszeit erwünscht, damit unter anderem hohe Tumor-zu-Hintergrund-Verhältnisse kurze Zeit nach der Injektion erzielt werden können, die für bildgebende Verfahren notwendig sind [26, 27]. Murine mAk zeigen eine durchschnittliche Halbwertszeit in Serum von 1 bis 3 Tagen und chimäre bzw. humanisierte Antikörper 1 bis 15 Tage [25, 28, 29]. Im Gegensatz dazu wurden für Fab- und F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente Serumhalbwertszeiten in Mäusen von 2 bis 5 h ermittelt. Diese korrelieren mit denen im Menschen [25].

### 2.3.2 F(ab')<sub>2</sub>-, Fab- und scFv-Fragmente

Die ersten Versuche, kleinere Fragmente mit Antigen-bindenden Eigenschaften zu generieren, basierten auf enzymatischen Modifikationen der IgG-Antikörper mit Papain oder Pepsin (Abbildung 3). Die so erzeugten Fab- und F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente haben eine Molekularmasse von 55 bzw. 110 kDa. Mit Hilfe molekularbiologischer Methoden können zusätzlich 28 kDa große scFv (*single chain variable fragments*) hergestellt werden. Diese bestehen aus den variablen Regionen der schweren und leichten Kette, welche über einen Peptidlinker miteinander verbunden sind [30]. Die genannten Antikörperfragmente zeigen aufgrund der verringerten Molekularmasse eine verbesserte Gewebepenetration in solide Tumore und verkürzte Serumhalbwertszeiten. Weiterhin können keine zytotoxischen Immunreaktionen ausgelöst werden, da die Fragmente nicht mehr über die Fc-Region verfügen [21]. Dennoch konnten auch Nachteile bei der Anwendung der F(ab')<sub>2</sub>-, Fab- und scFv-Fragmente aufgezeigt werden. Die Größe der Fab- und F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente ist teilweise ungeeignet, um Epitope zu erreichen, die aufgrund der räumlichen Anordnung schwer zugänglich sind [21]. Basierend auf dem enthaltenen Peptidlinker zeigen scFv eine größere Tendenz zur Aggregation und eine höhere Anfälligkeit gegenüber proteolytischer Spaltung. Dies resultiert in der Entfaltung des Konstrukts verbunden mit Funktionsverlust [31].



**Abbildung 3: Strukturen verschiedener IgG-Fragmente**

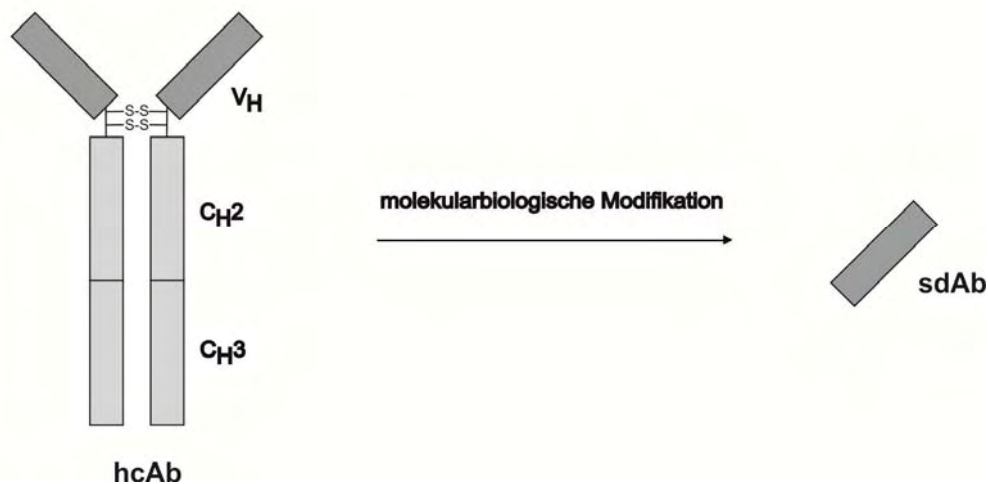
Der enzymatische Verdau intakter IgG mittels Pepsin oder Papain führt zur Generierung von F(ab')<sub>2</sub>- und Fab-Fragmenten. Eine weitere Gruppe der Antikörperfragmente bilden die scFv. Diese bestehen aus den variablen Domänen der komplementären Ketten, die über einen Peptidlinker miteinander verbunden sind.

### 2.3.3 Schwere-Ketten-Antikörper und Einzeldomänenantikörper

Ende der 1980er wurden erstmals Schwere-Ketten-Antikörper (*heavy chain antibody*, hcAb) in der Familie der Kamele entdeckt, welche eine Besonderheit im Aufbau gegenüber konventionellen IgG zeigen [32]. Wie in Abbildung 4 dargestellt, besitzen hcAb keine leichten Ketten, sondern bestehen ausschließlich aus zwei schweren Ketten, wobei die C<sub>H</sub>1-Domäne zusätzlich fehlt. Die Sequenz für diese Domäne ist im Genom vorhanden, wird jedoch während der mRNA-Prozessierung durch Spleißen entfernt [33, 34]. Weiterhin kommen hcAb natürlicherweise in Haien vor [35]. Auch im humanen Serum können hcAb präsent sein. Dies ist beim  $\gamma$ -Ketten-Typ des Franklin-Syndroms der Fall [36]. Hierbei verfügen die Antikörper allerdings über keinerlei Funktion. Vollständig funktionsfähig hingegen sind hcAb cameliden Ursprungs. Die Antigenbindungsstelle wird dabei allein durch die variable Domäne der schweren

Ketten repräsentiert. Diese bildet gleichzeitig die kleinste funktionelle Einheit, die Antigene bindet, und wird, wenn sie einzeln vorliegt, als Einzeldomänenantikörper (*single domain antibody*, sdAb) oder Nanobody™ bezeichnet.

Mit einer Molekularmasse von 12 bis 15 kDa sind sdAb somit nochmals kleiner als die bisher genannten Antikörperfragmente [32]. Sie verfügen über eine verbesserte Tumورpenetration in solide Tumore und eine schnellere Blut-Clearance. Aufgrund der geringen Größe können sdAb Epitope binden, die für intakte IgG unzugänglich sind [37]. Des Weiteren zeigen sdAb eine hohe Homologie mit humanen V<sub>H</sub>-Domänen, die wahrscheinlich mit einer geringen Immunogenität der Fragmente einhergeht [37, 38]. Sie sind gut in Wasser löslich und tendieren nur sehr wenig zur Aggregation. Dies beruht offenbar auf der Substitution hydrophober Reste im Vergleich zu konventionellen Antikörpern [39]. Darüber hinaus werden sdAb von einem einzelnen Gen exprimiert und verfügen über keinerlei posttranslationale Modifikationen, sodass sich Bakterien und Hefen als geeignete Expressionssysteme erwiesen haben [40, 41].



**Abbildung 4: Struktur der hcAb und sdAb**

Schwere-Ketten-Antikörper bestehen im Gegensatz zu konventionellen Antikörpern nur aus zwei konstanten Ketten. Deren variable Domäne trägt die Funktion der Antigenbindung. Gleichzeitig bildet diese die kleinste Antigen-bindende Einheit, einen Einzeldomänenantikörper, welcher mit Hilfe von molekulargenetischen Methoden generiert werden kann.

## 2.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Verschiedene Arbeitsgruppen haben sich bisher mit der Selektion, Generierung und Anwendung verschiedener anti-EGFR sdAb im Tumor-Targeting beschäftigt [39, 42]. Dabei erschien deren Einsatz bei nicht-invasiven Diagnostikverfahren, basierend auf hohen Tumor-zu-Hintergrund-Verhältnissen kurze Zeit nach Injektion, geringer Leberakkumulation und einer schnellen Blut-Clearance, als besonders viel versprechend [43, 44]. Um den Einsatz von sdAb noch effektiver zu gestalten, gibt es bereits erste Versuche, mehrere dieser Proteine an Nanopartikel zu binden. Nanopartikel bieten den Vorteil, mit mehreren Funktionalisierungen, wie zum Beispiel mit einem Fluoreszenzmarker und/oder einem Radionuklid, modifiziert und damit mit verschiedenen Verfahren im Rahmen der multimodalen Bildgebung detektiert zu werden. Die Kombination der Nanopartikel mit therapeutischen Radionukliden kann zudem für eine Tumorthherapie auf der Basis einer zusätzlichen internen Bestrahlung ausgenutzt werden. Weiterhin können Nanopartikel über Größen- und Oberflächenmodifikationen so gestaltet werden, dass sie eine bestimmte Verweildauer im Körper haben, um optimale Tumor-zu-Hintergrund-Verhältnisse zu erzielen. Im Idealfall können pro Partikel eine definierte Molekülzahl an sdAb kovalent gebunden werden, sodass erhöhte Affinitäten möglich sind. Einen weiteren Ansatz bieten Nanopartikel, die eine toxische oder zytostatische Substanz tragen, welche spezifisch gegen Tumore gerichtet sind und somit die Tumorbehandlung unterstützen. Bisher gibt es jedoch noch keine Arbeiten, bei denen anti-EGFR sdAb in Kombination mit Nanopartikeln für das Tumor-Targeting generiert worden sind.

Ziel dieser Arbeit war es, die zwei in der Literatur beschriebenen anti-EGFR sdAb EG2 und 7C12 in einem *E. coli* Stamm heterolog zu exprimieren und anschließend mittels immobilisierter Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC) zu reinigen und zu charakterisieren. Weiterhin sollten diese sdAb chemisch an die Oberfläche definierter Nanopartikel gebunden werden, um deren Zellbindung im Vergleich zu freien sdAb zu untersuchen. Die Überprüfung der Zellbindung erfolgte einerseits mittels radioaktiver Verbindungen im  $\gamma$ -Counter und andererseits via Fluoreszenz im konfokalen Fluoreszenzmikroskop.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Materialien

#### 3.1.1 Bakterienstämme und humane Zelllinien

Kompetente *E. coli* der Stämme NEB 5-alpha und SHuffle® T7 Express (ST7E) der New England BioLabs GmbH (Frankfurt / M., Deutschland) wurden für die Klonierung bzw. Expression der Einzeldomänenantikörper (sdAb) EG2 und 7C12 verwendet. Aufgrund von genetischen Modifikationen, die unter anderem die Präsenz einer zytoplasmatischen Disulfidbrückenisomerase zur Folge haben, ist *E. coli* ST7E in der Lage, innerhalb des Zytoplasmas Disulfidbrücken auszubilden [45].

Die vergleichenden Untersuchungen zur Zellbindung und Zellaufnahme der sdAb und Nanopartikelkonjugate wurden an den humanen, adhärent wachsenden Zelllinien A431 (CRL-2592) und FaDu (HTB-43) durchgeführt. Diese wurden von der *American Type Culture Collection (ATCC)* bezogen.

Die Zelllinie A431 stammt aus einem epidermoiden Karzinom einer 85 Jahre alten Frau und wurde im Jahr 1973 isoliert und etabliert [46]. FaDu-Zellen hingegen stammen aus einem Plattenepithelkarzinom des Hypopharynx eines 56-jährigen männlichen Patienten [47].

#### 3.1.2 Medium

Alle für die Herstellung der Medien verwendeten Reagenzien wurden von den Firmen Biochrom AG (Berlin, Deutschland) und Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

##### *Kultivierungsmedien*

Für die Kultivierung der verschiedenen humanen Zelllinien wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit stabilem Glutamin zusätzlich mit 10 % fötalem Kälberserum (FKS) versetzt

und bei 4 °C gelagert. FKS liefert hierbei neben wichtigen Hormonen Anheftungs- und Wachstumsfaktoren, die einen essentiellen Bestandteil der Kultivierung in Zellkulturflaschen darstellen. Vor der Verwendung des Mediums wurde es in einem Wasserbad auf 37 °C vortemperiert.

Die Vermehrung von *E. coli* hingegen erfolgte in Luria/Miller (LB)-Medium, welches folgende Zusammensetzung enthielt: 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, pH 7,0 ± 0,2. Die Lagerung des autoklavierten Mediums erfolgte bei Raumtemperatur (RT).

### *Kryomedium*

Damit die Zellen längerfristig in flüssigem Stickstoff gelagert werden konnten, wurde das Kultivierungsmedium zusätzlich mit 5 % (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO) versetzt. DMSO und FKS schützen die Zellen vor Frostschäden, indem die Ausbildung von Kristallen durch Bindung der Wassermoleküle verhindert wird. Das Kryomedium wurde aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt.

### **3.1.3 Materialien für die Zellkultur**

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter aseptischen Bedingungen durchgeführt, um Kontaminationen mit Bakterien oder anderen Zelllinien zu vermeiden. Nachfolgend sind die in der Zellkultur verwendeten Materialien aufgezeigt.

**Tabelle 1: Materialien für die Zellkultur**

<b>Geräte und Hilfsmittel</b>	<b>Information / Hersteller</b>
Autoklav	Varioklav® / Thermo Scientific (Karlsruhe, Deutschland)
Inkubator	CO <sub>2</sub> -Inkubator / Binder GmbH (Tuttlingen, Deutschland)

Inverses Mikroskop	Eclipse TS100 / Nikon GmbH (Düsseldorf, Deutschland)
Falcon Tube	15 ml; 50 ml / Greiner bio-one GmbH (Frickenhausen, Österreich)
Zellkulturflaschen mit Filter	25 cm <sup>2</sup> / Greiner bio-one GmbH (Frickenhausen, Österreich)
Kryoröhrchen	System 100 / Thermo Scientific (Karlsruhe, Deutschland)
Pipettierhilfe	accu jet pro / Brand GmbH & Co. KG (Wertheim, Deutschland)
Serologische Pipetten	5 - 50 ml / Nunc GmbH & Co. KG (Langenselbold, Deutschland)
Spritzen	10 ml Injekt <sup>®</sup> / B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland)
Spritzenfilter	Steril (0,2 µm) / VWR (Darmstadt, Deutschland)
Sterilbank	HeraSafe / Thermo Scientific (Karlsruhe, Deutschland)
24-/96-Well Platten	Nunclon™ Surface / Nunc GmbH & Co. KG (Langenselbold, Deutschland)
Wasserbad	Isotemp 210 / Fisher Scientific GmbH (Mannheim, Deutschland)
Zellzählgerät	Casy <sup>®</sup> Cell Counter / Roche Diagnostics Deutschland GmbH (Mannheim, Deutschland)
Zentrifuge	5804R / Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
<b>Substanzen und Reagenzien</b>	
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH (Seelze, Deutschland)
10 x PBS	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
1 x Trypsin/EDTA	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)

### 3.1.4 Materialien für die Generierung von Einzeldomänenantikörpern

**Tabelle 2: Materialien für die Generierung von Einzeldomänenantikörpern**

<b>Geräte und Hilfsmittel</b>	<b>Information / Hersteller</b>
Amicon <sup>®</sup> Ultra	Ultracel <sup>®</sup> -3K / Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Reagenzgläser	Dr. Ilona Schubert Laborfachhandel (Leipzig, Deutschland)
Microplate Reader	Varioskan / Thermo Scientific (Karlsruhe, Deutschland)
Reagenzglasschüttler	HLC by DITABIS AG (Pforzheim, Deutschland)
Schüttelkolben	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Spectra/Por <sup>®</sup> Float-A-Lyzer	0,5 – 1,0 kDa / Spectrum Europe B.V. (Breda, Niederlande)
Zentrifuge	Biofuge primoR / Thermo Scientific (Karlsruhe, Deutschland)
<b>Substanzen und Reagenzien</b>	
Bio-Rad DC <sup>™</sup> Protein Assay	Microplate Assay Protokoll / Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
GeneJET <sup>™</sup> Plasmid Miniprep	Kit / Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, Deutschland)
His60 Ni Superflow <sup>™</sup> Resin	Starterkit / Takara Bio Europe/Clontech (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich)
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Kanamycin	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
cOmplete Protease Inhibitor Cocktail	EDTA frei / Roche Diagnostics Deutschland GmbH (Mannheim, Deutschland)
<b>Enzyme und Plasmide</b>	
<i>Hind</i> III-HF <sup>™</sup>	R3104 / New England BioLabs GmbH (Frankfurt / M., Deutschland)



<i>Nco</i> I-HF™	R3193 / New England BioLabs GmbH (Frankfurt / M., Deutschland)
pET-26b(+) Plasmid DNA	Novagen® / Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
pET-28b(+) Plasmid DNA	Novagen® / Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Pierce Universal Nuclease	250 Units* $\mu$ l <sup>-1</sup> / ThermoFisher Scientific (Karlsruhe, Deutschland)
T4 DNA Ligase	M0202 / New England BioLabs GmbH (Frankfurt / M., Deutschland)

### 3.1.5 Materialien für die SDS-PAGE und den Western Blot

**Tabelle 3: Materialien für die SDS-PAGE und den Western Blot**

<b>Geräte und Hilfsmittel</b>	<b>Information / Hersteller</b>
Elektrophoresekammer und Zubehör	Mini-PROTEAN® 3 cell / Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
Imager	Stella / Raytest Isotopenmessgeräte GmbH (Straubenhardt, Deutschland)
Rotationsschüttler	Logic Shaker / neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Spannungsversorger	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
pH-Meter	HI2211 pH/ORP Meter / HANNA Instruments Deutschland GmbH (Kehl / R., Deutschland)
PVDF-Transfermembran	Immobilon®-P / Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
<b>Substanzen und Reagenzien</b>	
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)

---

30 % Acrylamid	Rothiphorese <sup>®</sup> -Gel 30 / Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Bio-Rad Opti-4CN™ Substrate Kit	Kit / Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
ColorPlus Protein Marker	Prestained / New England BioLabs (Deutschland)
Dithiothreitol	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Isopropanol	Fisher Scientific GmbH (Schwerte, Deutschland)
Methanol (MeOH)	Fisher Scientific GmbH (Schwerte, Deutschland)
Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
PageRuler™ Protein Ladder	Prestained / Thermo Scientific (Karlsruhe, Deutschland)
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH (Seelze, Deutschland)
Roti <sup>®</sup> -Blue	5x Konzentrat / Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Sodiumdodecylsulfate	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
Tetramethylethyldiamin	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
Thermomixer	2 ml / Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)

---

### 3.1.6 Materialien für die radioaktive Markierung

**Tabelle 4: Materialien für die radioaktive Markierung**

Geräte und Hilfsmittel	Information / Hersteller
Radioluminographie-Scanner	1800 II / Raytest Isotopenmessgeräte GmbH (Straubenhardt, Deutschland)
Pumpe	PerkinElmer® (Rodgau, Deutschland)
RP18-Säule	Eurospher / Knauer GmbH (Berlin, Deutschland)
Substanzen und Reagenzien	
<sup>99</sup> Mo/ <sup>99m</sup> Tc-Generator	ROTOP Pharmaka GmbH (Dresden, Deutschland)

### 3.1.7 Materialien für die Nanopartikel-Konjugation

**Tabelle 5: Materialien für die Nanopartikel-Konjugation**

Gerät und Hilfsmittel	Information / Hersteller
Thermomixer	2 ml / Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Substanzen und Reagenzien	
β-Alanin	VWR (Darmstadt, Deutschland)
1-Ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)carbodiimid (EDC)	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Micromer® redF	10 mg/ml / micromod Partikeltechnologie GmbH (Rostock, Deutschland)
Sulfo-N-Hydroxysuccinimid (Sulfo-NHS)	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH (Seelze, Deutschland)

### 3.1.8 Puffer und Lösungen

Alle nachfolgend aufgeführten Puffer und Lösungen wurden, wenn nicht anders beschrieben, bei Raumtemperatur (RT) gelagert. Die Chemikalien stammten von den Firmen Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH (Seelze, Deutschland), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland) und VWR (Darmstadt, Deutschland).

#### 10 % APS

APS	1 g
Ad ddH <sub>2</sub> O	10 ml

Die Lagerung von 500 µl Aliquots erfolgte bei -20 °C.

#### 1 M DTT

DTT	1,54 g
10 mM Natriumacetat	10 ml

Die Lösung wurde steril filtriert (0,22 µm) und in 500 µl Aliquots bei -20°C gelagert.

#### 0,5 M IPTG

IPTG	0,595 g
Ad ddH <sub>2</sub> O	5 ml

Die Lösung wurde steril filtriert (0,22 µm) und in 1 ml Aliquots bei -20°C gelagert.

**6 x Laemmli-Puffer [48]**

SDS	1,2 g
Glycerin	3,0 ml
Bromphenolblau	0,6 g
1 M Tris/HCl ( pH 6,8)	3,0 ml
Ad ddH <sub>2</sub> O	10 ml

Für die SDS-PAGE wurde der Probenpuffer in der einfachen Konzentration eingesetzt. Weiterhin wurde DTT den Proben kurz vor der Verwendung in 100 mM Endkonzentration zugesetzt.

	<b>1,5 M Trenngelpuffer pH 8,8</b>	<b>1,0 M Sammelgelpuffer pH 6,8</b>
Tris	45,43 g	30,28 g
Ad ddH <sub>2</sub> O	250 ml	250 ml

Zum Lösen wurden beide Puffer auf 50 °C erhitzt und der entsprechende pH-Wert mit 5 M HCl eingestellt.

**10 x PBS**

NaCl	80 g
KCl	2,0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	200 ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g
Ad ddH <sub>2</sub> O	1 l

Alle Substanzen wurden in 800 ml ddH<sub>2</sub>O gelöst und der pH-Wert mit 5 M HCL auf 7,4 eingestellt.

**Phosphatpuffer nach Sørensen [49, 50]**

Stammlösung A: Kaliumdihydrogenphosphat	9,078 g
Stammlösung B: Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	11,876 g

Die Substanzen wurden jeweils in ddH<sub>2</sub>O gelöst und auf 1 l aufgefüllt.

**5 x SDS Laufpuffer**

Tris	15,1 g
Glycin	72,0 g
SDS	5,0 g
Ad ddH <sub>2</sub> O	1 l

**1 M TCEP**

TCEP	0,143 g
Ad ddH <sub>2</sub> O	1 ml

Die Lösung wurde steril filtriert (0,22 µm) und bei -20°C gelagert.

**0,1 % 2,4,6-Trinitrobenzensulfonsäure (TNBS)**

1 M TNBS	34 µl
Ad ddH <sub>2</sub> O	10 ml

Die Lösung wurde im Dunkeln bei 4 °C gelagert.

**Transferpuffer**

Tris	3,03 g
Glycin	14,4 g
MeOH	200 ml
SDS	1 g
Ad ddH <sub>2</sub> O	1 l

**50 x TAE**

Tris	242 g
0,5 M Na <sub>2</sub> EDTA (pH 8,0)	100 ml
Essigsäure	57,1 ml
Ad ddH <sub>2</sub> O	1 l

**3.1.9 Software**

Die AIDA-Software der Firma Isotopenmessgeräte GmbH diente der optischen Erfassung und Dokumentation Coomassie-gefärbter SDS-Gele. Gele, die radioaktive Proben enthielten, wurden mittels Radioluminographie-Scanner (Raytest Isotopenmessgeräte GmbH) ausgelesen. Die Auswertung und Darstellung erfolgte jeweils mittels CorelDRAW<sup>®</sup> X5. Mit Hilfe des Microplate-Readers Varioskan (Thermo Scientific) und der SkanIt-Software wurden photometrische Daten und fluoreszierende Signale erfasst und nachfolgend mit Microsoft Excel<sup>®</sup> 2010 ausgewertet.

**3.2 Zellkulturarbeiten****3.2.1 *In-vitro*-Kultivierung humaner Zelllinien***Kryokonservierung von Zellen*

Um die A431- und FaDu-Zellen längerfristig lagern zu können, wurden diese jeweils bis zu einer 80 - 90 %igen Konfluenz kultiviert, trypsiniert und in Zentrifugenröhrchen transferiert. Die anschließende Zentrifugation erfolgte bei 4 °C, 250 x g für 5 min. Die Zellpellets wurden jeweils in 2 ml Kryomedium resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. In einer Einfrierbox wurden die Zellen zunächst bei -70 °C langsam eingefroren und nach 24 h bei -150 °C gelagert.

### *Auftauen eingefrorener Zellen*

Die bei -150 °C gelagerten Zellen wurden schnell in einem Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurden die Zellen mit 5 ml Medium vorsichtig gewaschen und abzentrifugiert. Die Zentrifugation erfolgte bei 200 x g für 5 min. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 3 ml vortemperiertem Kultivierungsmedium vorsichtig resuspendiert und in 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen mit je 10 ml Medium ausgesät. Nach 24 h Adhärenz unter Standardkultivierungsbedingungen wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um Rückstände an DMSO vollständig zu entfernen.

### *Subkultivierung der Zellen*

Alle verwendeten Zelllinien wurden in 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen bei einer Temperatur von 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt kultiviert. Dies entsprach den Standardkultivierungsbedingungen. Dabei erfolgte regelmäßig eine mikroskopische Überprüfung der Zellmorphologie, Konfluenz und Kontaminationsfreiheit. Zeigten die Kulturen eine Konfluenz von 90 %, wurden diese passagiert. Hierfür wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Kulturflasche mit vortemperiertem PBS gewaschen, um Mediumrückstände und tote Zellen vollständig zu entfernen. Zum Ablösen der Zellen wurden diese mit 1 ml 1 x Trypsin/EDTA für 5 - 10 min bei 37 °C inkubiert. Mit der Zugabe von 5 ml frischem Medium wurde die Reaktion gestoppt. Dabei war stets darauf zu achten, dass eine gute Durchmischung durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren erfolgte. Anschließend wurde die Zellsuspension in einen Falcon Tube transferiert und zentrifugiert. A431-Zellen wurden hierbei bei RT und 300 rpm für 5 min pelletiert. Die Zentrifugation der FaDu-Zellen hingegen erfolgte bei 150 rpm für 10 min. Die Zellpellets wurden jeweils in 6 ml Kultivierungsmedium aufgenommen. Nach Bestimmung der Zellzahl und Vitalität mittels Casy<sup>®</sup> Cell Counter wurden die Zellen entsprechend ihres Teilungsverhältnisses (*split ratio*) 1:3 bis 1:8 in neue Zellkulturflaschen ausgesät. Um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen innerhalb des Mediums gewährleisten zu können, wurden die Kulturflaschen leicht geschwenkt. Innerhalb der nächsten 24 h folgte die Phase der Adhärenz unter Standardkultivierungsbedingungen.



### 3.2.2 Zellzahlbestimmung

Für die Bestimmung der Zellzahl wurde der Zellzähler *Casy<sup>®</sup> Cell Counter* verwendet, wobei das Messprinzip auf einer kombinierten Anwendung der Pulsflächenanalyse und Widerstandsmessung basiert. Mit Angabe der Vitalität wird neben einer quantitativen auch eine qualitative Beurteilung der Zellen ermöglicht, da der Widerstand abhängig ist vom Volumen und physiologischen Zustand der angesaugten Zellsuspension. Für die Zellzahlbestimmung wurde die Suspension definiert 1:100 in einem schwachen Elektrolyten (*Casyton*) verdünnt. Vitale Zellen und Zelldebris verdrängen beim Passieren der Kapillare entsprechend ihrem Volumen eine bestimmte Menge an Elektrolytlösung und bewirken damit eine unterschiedliche Erhöhung des Widerstands. Diese Änderung ist ein Maß für das Volumen der Zellen und Zelltrümmer.

## 3.3 Biochemische Methoden

### 3.3.1 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung nach Lowry *et al.* [51] wurde modifiziert, in Form des DC Protein Assays von Bio-Rad Laboratories GmbH, in 96-Well Platten durchgeführt. Als Standard für die Eichgerade wurde BSA verwendet. Die Verdünnungsreihe, welche 0,1 mg/ml bis 1,0 mg/ml Protein enthielt, wurde stets in 1 x PBS frisch hergestellt. Für den Assay wurden zunächst jeweils in Dreifachbestimmung 5 µl des Standards bzw. der zu messenden Proteinproben vorgelegt. Nachfolgend wurden pro Well 25 µl Reagenz A und 200 µl Reagenz B hinzupipettiert, gemischt und der Reaktionsansatz für 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Die photometrische Messung erfolgte anschließend bei 750 nm im Microplate Reader.

### 3.3.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Gelelektrophoresen dienen im Allgemeinen der Trennung von Molekülen, die eine Nettoladung tragen. Für diesen Vorgang wird ein elektrisches Feld benötigt, innerhalb dessen unter anderem

Proteine wandern können. Die Laufstrecke, welche die Moleküle innerhalb des Polyacrylamidgels zurücklegen, ist in erster Hinsicht abhängig von deren Molekularmasse. Der Einsatz diskontinuierlicher Elektrophoresen, die durch unterschiedliche pH-Werte gekennzeichnet sind, ermöglicht eine scharfe Bandenbildung und vermeidet die Aggregation der Proteinproben.

Die Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels ist der nachfolgenden Übersicht zu entnehmen. Nach Gießen des Sammelgels wurde dieses mit Isopropanol beschichtet, um ein Austrocknen zu vermeiden.

50 µl der zu untersuchenden Proben wurden mit 10 µl 6 x SDS-Probenpuffer versetzt und bei 99 °C für 5 min gekocht und auf das Gel aufgetragen. Der Trennvorgang erfolgte bei konstanten 20 mA und RT. Anschließend wurden die Gele mit Roti<sup>®</sup>-Blue angefärbt.

	<b>15%iges Trenngel</b>	<b>5%iges Sammelgel</b>
ddH <sub>2</sub> O	1,10 ml	3,40 ml
30 % Acrylamidlösung	2,50 ml	0,83 ml
Trenngelpuffer	1,30 ml	-----
Sammelgelpuffer	-----	0,63 ml
10 % SDS	0,05 ml	0,05 ml
10 % APS	0,05 ml	0,05 ml
TEMED	0,002 ml	0,002 ml

### 3.3.3 Western Blot

Der Western Blot (WB) diente dem spezifischen Nachweis der Zielproteine EG2 und 7C12. Hierfür wurden die Proben zunächst in einer SDS-PAGE aufgetrennt und nachfolgend in einem Tank Blot auf eine PVDF-Membran transferiert. In Vorbereitung wurden je zwei Faserpads und Filterpapiere, das Gel und die Membran in Transferpuffer für 15 min equilibriert, wobei letztere zusätzlich zuvor mit Methanol benetzt werden musste. Der Blotvorgang erfolgte bei 350 mA und RT für 1 h. Nach dem Transfer wurde die Membran in 5 % Milchpulver 1 h blockiert. Im Anschluss wurden die sdAb über das poly-Histidin-Peptid mit einem Bio-Rad Opti-4CN™

Substrat Kit detektiert. Die Vorgehensweise entsprach dabei den Herstellervorgaben. Der verwendete anti-His<sub>6</sub>-Antikörper (Takara Bio Europe/Clontech) wurde 1:5000 eingesetzt.

### 3.3.4 Dot-Blot

Der Dot-Blot stellte eine schnelle Alternative zum WB dar, sdAb zu detektieren. Die PVDF-Membran wurde mit Methanol benetzt, mit PBST gewaschen und vorsichtig abgetupft, sodass anschließend 10 µl der zu untersuchenden Proben aufgetropft werden konnten. Die an der Luft getrocknete Membran wurde wieder mit Methanol benetzt und kurz mit TBST gewaschen. Der Blockierungsschritt mit Milchpulver und die folgende Detektion entsprachen dem Ablauf beim WB.

### 3.3.5 Nachweis von Disulfidbrücken

Die Ausbildung von Disulfidbrücken in Proteinen, die eine für die Stabilität wichtige Funktion übernehmen, ist in *E. coli* üblicherweise nur im Periplasma möglich, da im Zytoplasma reduzierende Bedingungen vorherrschen. In dieser Arbeit wurde mit *E. coli* ST7E ein spezieller Bakterienstamm verwendet, bei dem, aufgrund genetischer Modifikationen, die zytoplasmatische Ausbildung von Disulfidbrücken möglich ist. Um die Präsenz dieser Bindungen bestätigen zu können, sollte der Gehalt oxidiertes SH-Gruppen in den zytoplasmatisch exprimierten sdAb EG2 und 7C12 ermittelt werden.

Hierfür wurde ein nach Guglielmi und Pierre [52] modifiziertes Procedere etabliert.

Ein Reaktionsansatz umfasste 50 µg Protein und 300 µl DB-Puffer. Dieser enthielt 4 M Harnstoff, 1 x PBS und ddH<sub>2</sub>O. 150 µl des Ansatzes wurden zusätzlich mit Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) in einer Endkonzentration von 10 mM komplettiert. Hierbei handelt es sich um ein Reduktionsmittel, welches die selektive Reduzierung von Disulfiden zur Folge hat. Die reduzierte Probe wurde mit S<sub>red</sub> bezeichnet, die nicht-reduzierte mit S<sub>ox</sub>. Die Inkubation von S<sub>red</sub> und S<sub>ox</sub> erfolgte bei RT für 1h. Anschließend wurden die Proteine mit Aceton gefällt, um das TCEP zu entfernen, welches Einfluss auf die photometrische Messung hätte. Die in 60 µl DB-Puffer resuspendierten Pellets wurden mit dem gleichen Volumen des

Nachweisreagenzes DTNBx2 (Ellmann's Reagenz) versetzt und photometrisch bei 412 nm in 96-Well Platten vermessen. Als Negativkontrolle wurde jeweils ein Ansatz mitgeführt, der anstelle des Proteins 1 x PBS enthielt.

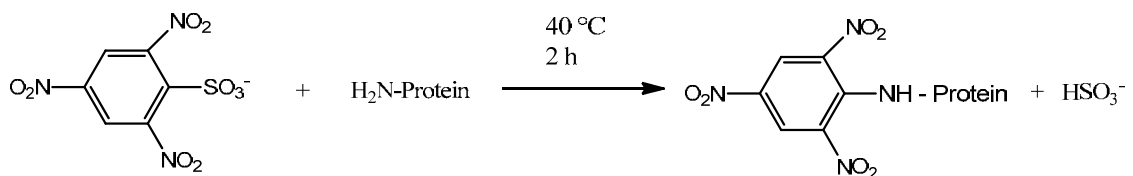
Die Berechnung des Anteils der oxidierten Disulfidbrücken in den sdAb basierte auf der folgenden Gleichung:

$$\text{Anteil oxidierter Disulfidbrücken [\%]} = 100\% - \left( \frac{A_{412nm} \{S_{ox}\}}{A_{412nm} \{S_{red}\}} * 100 \right) \quad (1)$$

### 3.3.6 Quantitative Bestimmung von freien Aminogruppen

Ein weiterer Bestandteil der Charakterisierung der sdAb lag in der Bestimmung des Gehalts freier Aminogruppen mit 2,4,6-Trinitrobenzensäure (TNBS). Hierfür wurde ein nach Habeeb [53] modifizierter Microassay etabliert.

50 µg des jeweiligen sdAb wurden mit 100 µl 10 mM Tris-HCl pH 8,0 und 100 µl 0,1 % TNBS versetzt und für 2 h bei 40 °C inkubiert. Dabei reagierten freie primäre Aminogruppen mit TNBS zu orange-gelb gefärbten Produkten (Abbildung 5).



**Abbildung 5: Reaktionsgleichung freier Aminogruppen mit TNBS**

Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 100 µl 10 % SDS und 50 µl 5 M HCl gestoppt. Das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes betrug 375 µl. Anschließend erfolgte die photometrische Messung des Farbkomplexes bei 335 nm in Mikrotiterplatten, wobei jeweils

150 µl der Ansätze verwendet wurden. Zusätzlich wurde ein Glycin-Standard vermessen, anhand dessen Geradengleichung der Gehalt freier Aminogruppen der sdAb-Proben ermittelt wurde.

### **3.3.7 Acetonfällung von Proteinen**

Zu fällende Proteinproben wurden mit 5 Volumen eiskaltem (-20 °C) Aceton versetzt und gut durchmischt. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei -20 °C wurde das Präzipitat bei 6.000 x g für 5 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet luftgetrocknet.

## **3.4 Molekularbiologische Methoden**

Die nachfolgenden Arbeiten für die Klonierung und Transformation der *E. coli* Stämme wurden von Herrn Dr. Kristof Zarschler durchgeführt.

### **3.4.1 Synthese der kodierenden Sequenzen der Einzeldomänenantikörper**

Die publizierten Aminosäuresequenzen der Einzeldomänenantikörper wurden zunächst mittels Sequence Manipulation Suite in die entsprechenden kodierenden Sequenzen überführt [54]. Nach dem Einführen einer Erkennungsstelle der Restriktionsendonuklease *NcoI* bzw. *HindIII* am 5'- und 3'-Ende, wurden diese Sequenzen durch die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert, in den Vektor pEX-A kloniert und versendet.

### 3.4.2 Transformation, Plasmid-Isolierung und DNA-Sequenzierung

Die kommerziell erhältlichen chemisch kompetenten *E. coli* Zellen der Stämme NEB 5-alpha und SHuffle® T7 Express wurden nach den Angaben des Herstellers transformiert. Die Selektion erfolgte in Abhängigkeit vom eingesetzten Plasmid durch Inkubation der Transformationsansätze auf LB-Agarplatten mit 50 µg/ml Kanamycin bzw. mit 100 µg/ml Ampicillin über Nacht bei 37 °C.

Die Minipräparation der Plasmide aus *E. coli* NEB 5-alpha erfolgte mit dem GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific) nach Angaben des Herstellers. Die DNA-Sequenzierung der Plasmide wurde von der DNA Sequencing Facility des Max-Planck-Instituts für Molekulare Zellbiologie und Genetik (Dresden, Deutschland) durchgeführt.

### 3.4.4 Restriktionsverdau von DNA

Zur Isolierung der kodierenden Sequenzen der sdAbs aus pEX-A erfolgte die Restriktion der Plasmide in 60 µL-Ansätzen. Pro Ansatz wurden 0,5 bis 1 µl der Restriktionsendonukleasen *NcoI*-HF™ und *HindIII*-HF™ (New England BioLabs GmbH) und 1/10 des Gesamtvolumens an 10 x NEB4-Puffer eingesetzt und dem Restvolumen an DNA zugegeben. Der Restriktionsverdau für die Klonierung erfolgte für 2 h bei 37 °C.

### 3.4.5 Agarosegelelektrophorese

Für die Agarosegelelektrophorese wurden wegen der geringen Größe der sdAb-kodierenden DNA-Sequenzen 1,5 %-ige (w/v) Agarosegele verwendet. Die entsprechende Menge an Agarose wurde in 1 x TAE-Puffer gegeben und in der Mikrowelle aufgeköcht, bis die gesamte Agarose gelöst war. Zur Färbung der DNA wurde RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution (iNtRON Biotechnology Inc, Korea) zur handwarmen Agarose-Lösung pipettiert. Die Agarose-Lösung wurde in einen Gelträger, in dem zuvor der Probenkamm eingesetzt wurde, gegossen.

Nach der Polymerisation des Agarosegels wurde der Gelträger in die Elektrophoresekammer gesetzt, mit 1 x TAE-Puffer überschichtet und der Probenkamm entfernt. Die zu analysierenden Proben wurden mit 6 x DNA-Ladepuffer (New England BioLabs GmbH) zu einer 1-fachen Endkonzentration versetzt und in die vom Kamm im Gel hinterlassenen Taschen pipettiert. Daneben wurde der DNA-Längenstandard (1 kb DNA Ladder; New England BioLabs GmbH) aufgetragen, um die Größe der DNA-Fragmente im Gel bestimmen zu können. An die Gelkammer wurde anschließend eine Spannung von 100 V angelegt und das Resultat des Gellaufs unter einer UV-Lampe betrachtet.

### **3.4.6 DNA-Reinigung und -Extraktion aus Agarosegelen**

Die Reinigung von DNA-Fragmenten wurde mit dem GeneJET™ PCR Purification Kit (Thermo Scientific) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Nach einer Agarosegelelektrophorese konnte die Extraktion von DNA-Fragmenten aus dem Gel erfolgen, indem die interessierenden Fragmente anhand ihrer Größe unter einer UV-Lampe identifiziert und mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten wurden. Anschließend wurden die DNA-Fragmente mit dem GeneJET™ Gel Extraction Kit (Thermo Scientific) aus dem Gelstück nach Angaben des Herstellers extrahiert.

### **3.4.7 Ligation von DNA**

Die Ligation der isolierten DNA-Fragmente und den Plasmiden pET26b bzw. pET28b erfolgte in 10 µl-Ansätzen. Die Volumina an Insert-DNA und Plasmid-DNA wurden für die Reaktion so gewählt, dass ihr molares Verhältnis mindestens 3:1 betrug. Dem Ansatz wurden 1 µl 10 x Ligase-Reaktionspuffer und 1 µl T4 DNA-Ligase (New England BioLabs GmbH) zugegeben und mit bidest. Wasser aufgefüllt. Der Ansatz wurde über Nacht bei 16 °C inkubiert und anschließend wie unter 3.4.2 beschrieben in *E. coli* NEB 5-alpha transformiert.

### 3.4.8 Kolonie-PCR

Zur Identifizierung von *E. coli*-Kolonien, die nach der Transformation das Plasmid mit dem gewünschten Insert trugen, wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Mit einer sterilen Pipettenspitze wurde dazu Zellmaterial einer Kolonie von der Agarplatte gepickt und in den in Tabelle 6 dargestellten 25 µl-Ansatz überführt. Zum Einsatz kam hier ein Taq 5X Master Mix (New England BioLabs GmbH) und die Primer T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') und T7term (5'-CTAGTTATTGCTCAGCGGT-3'). Das Programm für die Kolonie-PCR ist in Tabelle 7 aufgeführt.

**Tabelle 6: Pipettierschema für die Kolonie-PCR**

Komponente	Volumen pro Ansatz
ddH <sub>2</sub> O	19 µl
Primer T7	0,5 µl
Primer T7term	0,5 µl
Taq 5X Master Mix	5 µl

**Tabelle 7: Parameter für die Kolonie-PCR**

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	
Denaturierung	95 °C	30 s	30 Zyklen
Annealing	50 °C	60 s	
Elongation	68 °C	60 s	
Finale Elongation	68 °C	5 min	



## 3.5 Präparative Methoden

### 3.5.1 Kultivierung von *E. coli* SHuffle® T7 Express

In Vorversuchen sollte zunächst die Expression der sdAb EG2 und 7C12 vergleichend im Zytoplasma und Periplasma von *E. coli* SHuffle® T7 (ST7E) Express untersucht werden. Hierfür wurden Vorkulturen der mit den Plasmiden pET26b bzw. pET28b transformierten *E. coli* in 5 ml LB-Medium hergestellt. Damit eine selektive Kultivierung erfolgen konnte, wurde das Medium mit Kanamycin versetzt. Die Endkonzentration betrug dabei 50 µg/ml. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 400 rpm in einem Schüttler über Nacht (ÜN). Für die Hauptkultur wurden 50 ml LB-Medium ebenfalls mit Kanamycin versetzt, mit der entsprechenden *E. coli*-Vorkultur 1:100 angeimpft und bei 37 °C inkubiert. Um die Sauerstoffversorgung innerhalb der Kulturen zu gewährleisten, wurden diese mit Hilfe eines Magnetrührers bei 400 rpm gerührt. Bei einer optischen Dichte (OD<sub>600</sub>) zwischen 0,5 und 1,0 wurde die Expression mit 1 mM IPTG induziert. Hierfür wurde nach 5 h Inkubation eine Probe photometrisch bei 600 nm vermessen. Die Expression der sdAb erfolgte ÜN bei RT und 400 rpm.

Für eine Expression der sdAb im größeren Maßstab wurden 250-ml-Hauptkulturen mit einer entsprechenden Vorkultur 1:50 angeimpft. Aufgrund des größeren Volumens wurden die Kulturen bei 750 rpm gerührt. Die weitere Vorgehensweise entsprach den Vorversuchen.

Die Expression der sdAb in *E. coli* ST7E wurde mittels WB überprüft. Für die Vorbereitung der Proben wurde jeweils 1 ml der Hauptkulturen bei 10.000 x g für 5 min zentrifugiert und das Zellpellet in 100 µl 1 x SDS-Probenpuffer resuspendiert.

### 3.5.2 Reinigung von Einzeldomänenantikörpern

Die sdAb wurden mittels immobilisierter Metallchelate-Affinitätschromatographie (*Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography*, IMAC) unter Verwendung von *His60 Ni Superflow™ Gravity* Säulen und dem dazugehörigen Puffer-Kit (Takara Bio Europe/Clontech) gereinigt. Der Lysepuffer (*xTractor Buffer*) und der Elutionspuffer wurden mit einem EDTA-freien Proteaseinhibitor versetzt, um eine mögliche Degradation der sdAb während der Aufarbeitung zu vermeiden.

Die Probenvorbereitung umfasste zunächst die Zellyse. Hierfür wurden die Hauptkulturen bei 5.000 rpm und 4 °C für 15 min zentrifugiert und das Zellpellet anschließend in Lysepuffer resuspendiert. Dabei wurde 1 ml Puffer pro 200 mg Pellet eingesetzt. Weiterhin wurde der Zellsuspension, zur Reduktion der Viskosität, Endonuclease (Universal Nuclease, Thermo Scientific) zugesetzt. Die Verdünnung betrug hierbei 0,1 µl Enzym pro 1 ml Suspension. Nach einer 15-minütigen Inkubation auf Eis erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 10.000 x g und 4 °C für 20 min. Der Überstand enthielt das Zielprotein. Der weitere Ablauf entsprach den Vorgaben des Herstellers, wobei die Inkubationszeit auf 30 min reduziert wurde, um unspezifische Interaktionen des Zellysats mit dem Säulenmaterial zu vermindern.

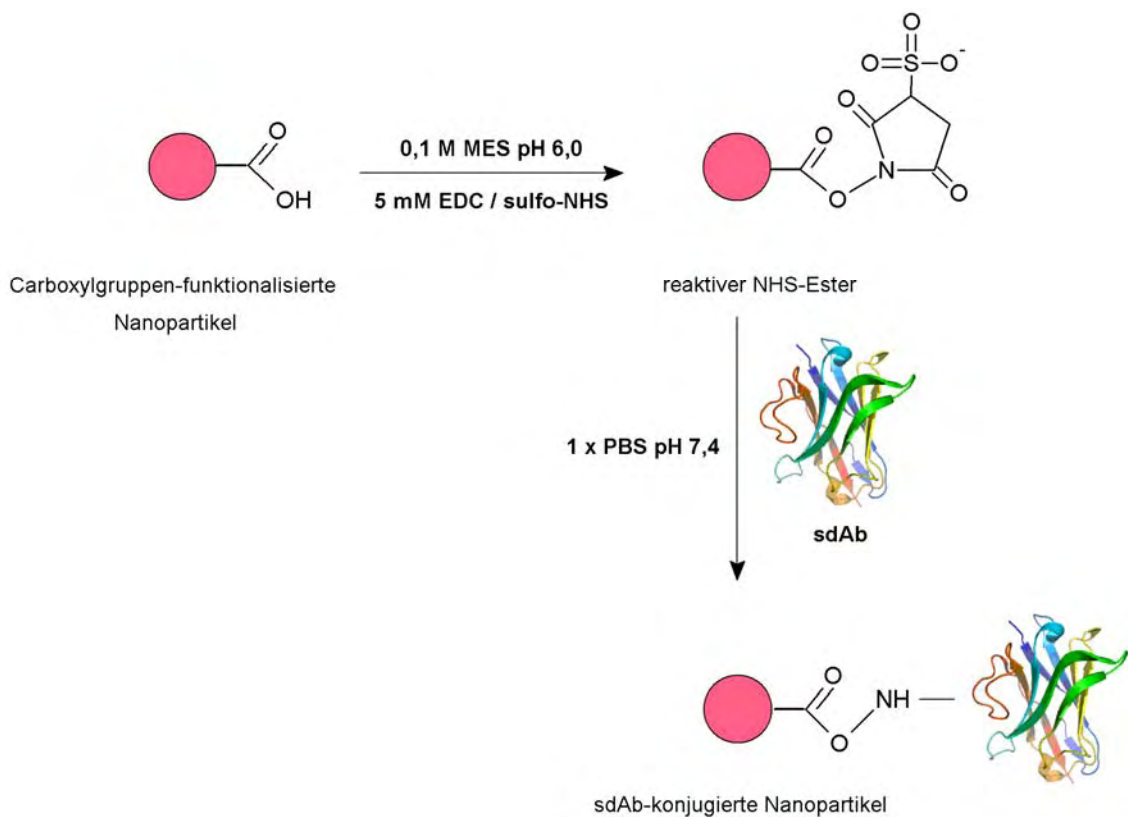
### **3.5.3 Dialyse und Aufkonzentrierung**

Für eine bessere Lagerfähigkeit und Langzeitstabilität der sdAb wurden die Elutionsfraktionen gegen 1 x PBS dialysiert. Hierfür wurden Dialyseeinheiten mit einer Ausschlussgröße (*molecular weight cut off*, MWCO) von 3 kDa verwendet. Der Dialysevorgang erfolgte entweder bei RT für 5 h oder bei 4 °C ÜN. Im Anschluss wurden die dialysierten Proben unter Verwendung von Amicon®-Ultra-4-Zentrifugenfilter mit einem MWCO von 3 kDa aufkonzentriert. Die Bedingungen hierfür wurden wie folgt gewählt: 7.000 x g, 20 °C, 20 min.

### **3.5.4 Konjugation von Einzeldomänenantikörpern an Nanopartikel**

Die Konjugation funktionalisierter Nanopartikel und sdAb basierte auf Grundlage der EDC/sulfo-NHS-Reaktion zur Aktivierung und Kupplung von Carboxylgruppen mit primären Aminen. Der Vorteil von sulfo-NHS gegenüber dem unsubstituierten NHS ist dessen gute Löslichkeit in Wasser und dessen stabilisierender Effekt auf Aktivester, die durch die Aktivierung der Carboxylgruppen mit EDC entstehen [55]. Die Konjugation wurde in einem Zwei-Schritt-Modus durchgeführt, um die Bildung von Multimeren der sdAb zu vermeiden.

Zunächst erfolgte die Aktivierung der Carboxylgruppen der PMMA-Nanopartikel. Hierfür wurden 1 mg Nanopartikel in 1 ml 0,1 M MES Puffer (pH 6,0) suspendiert, mit jeweils 5 mM EDC und sulfo-NHS versetzt und für 1 h bei 600 rpm und RT im Thermoschüttler inkubiert. Anschließend wurden die aktivierten Partikel dreimal mit 1 x PBS via Spinfiltration bei 3.000 x g für 7 min gewaschen. Die gewaschenen Partikel wurden in 1 x PBS aufgenommen und mit 400 µg EG2 bzw. 7C12 versetzt, wobei das Gesamtvolumen der Reaktionsansätze je 1 ml betrug. Diese wurden für 3 h bei 600 rpm und RT im Thermoschüttler inkubiert. Um freie Bindungsstellen der Nanopartikel abzusättigen, wurde den Ansätzen nach der Reaktion, für eine weitere 30-minütige Inkubation, 25 mM Glycin hinzugefügt. Weiterhin folgten drei Waschschrte und die Lagerung der Nanopartikel in 500 µl 1 x PBS bei 4 °C.



### Abbildung 6: Schema zur Nanopartikelkonjugation

Die mit Carboxylgruppen funktionalisierten PMMA-Nanopartikel wurden in 0,1 M MES Puffer suspendiert, mit je 5 mM EDC und sulfo-NHS versetzt und der Ansatz für 30 min bei RT inkubiert. Nach drei Waschschrten erfolgte die Konjugation der aktivierten Nanopartikel mit den sdAb 7C12 bzw. EG2 in 1 x PBS für 3 h bei RT. Die Konjugate wurden anschließend bei 4 °C in PBS gelagert. Die dreidimensionale Darstellung des cameliden sdAb wurde folgender Webseite entnommen: [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/ef/113V\\_%28Lama\\_VHH\\_domain\\_unligated%29.png](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/ef/113V_%28Lama_VHH_domain_unligated%29.png)

## 3.6 Spektroskopische Methoden

### 3.6.1 UV-VIS-Spektroskopie

Die Absorption von Proteinen wird durch vorhandene Peptidbindungen, Disulfidbrücken und Aminosäureseitenketten verursacht. Dabei liefern die aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan im Wellenlängenbereich zwischen 250 und 320 nm den größten Beitrag.

Für die Bestimmung des Proteingehalts einer Lösung wurden zunächst UV-VIS-Spektren der sdAb 7C12 und EG2 im Bereich von 190 bis 450 nm aufgenommen, um Absorptionsmaxima zu identifizieren. Weiterhin wurde jeweils eine Konzentrationsreihe der sdAb, die 0,1 bis 0,8 mg/ml Protein enthielt, vermessen, um die entsprechenden Extinktionskoeffizienten in 1 x PBS zu ermitteln. Mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes und der Messung der Absorption bei 280 nm konnten anschließend die Proteinkonzentrationen von Lösungen bestimmt werden. Dies basierte auf der folgenden Gleichung:

$$A_{280nm} = \epsilon_{280nm} * c * d = \frac{\epsilon_{280nm}}{M} * c_M * d \quad (2)$$

A: Absorption bei 280 nm

$\epsilon$ : molarer Extinktionskoeffizient bei 280 nm [ $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ]

c: Proteinkonzentration [M]

d: Schichtdicke der Küvette [cm]

M: Molmasse [g/mol]

$c_M$ : Proteinkonzentration [g/l]

Für die Absorptionmessungen wurden Küvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm verwendet. Als Referenz wurden stets Proben mitgeführt, die aus der gleichen Matrix bestanden, ohne jedoch den sdAb zu enthalten.

### 3.6.2 Dynamische Lichtstreuung und Zetapotential

Die Dynamische Lichtstreuung (DLS) ist eine Methode für die Bestimmung hydrodynamischer Durchmesser von Molekülen und Partikeln. Dabei wird das eingestrahlte Laserlicht von den in einer Lösung befindlichen Partikeln unterschiedlich stark gestreut und die Streuung von Detektoren registriert. Basierend auf der Stokes-Einstein-Beziehung können die ermittelten Daten mit Hilfe der Zetasizer Software in Partikelgrößen bzw. Partikelgrößenverteilungen konvertiert werden. Der Polydispersitätsindex (PDI) dient hierbei als ein Qualitätsmerkmal. Dieser ist ein Maß für die Größenverteilung der Partikel in dem gemessenen System. Für rein monodisperse Lösungen wird ein PDI von  $< 0,01$  erwartet. Ist der PDI hingegen  $< 0,2$ , spricht dies für annähernd monodisperse Lösungen [56].

Das Zetapotential ist das elektrische Potential an der Abscherschicht sich in einer Lösung bewegender Teilchen. Es kann indirekt über die Messung der elektrophoretischen Mobilität von Partikeln ermittelt werden. Hierfür sind entsprechende Messzellen beidseitig mit Elektroden versehen, über die ein elektrisches Feld angelegt wird, innerhalb dessen die geladenen Teilchen wandern. Dies wiederum führt aufgrund des Doppler-Effekts zur Änderung der Frequenz des gestreuten Lichts. Dies bildet die Grundlage für die Ermittlung der Geschwindigkeit, mit der sich die Partikel durch das Feld bewegen. Die Geschwindigkeit wiederum stellt ein Maß für das Zetapotential dar [57].

Für die hier durchgeführten Messungen wurde ein Malvern Zetasizer Nano ZS mit einem 633 nm Laser verwendet. Bidestilliertes Wasser diente als Lösungsmittel für die DLS bzw. für die Ermittlung des Zetapotentials.

### 3.7 Radiomarkierung von Einzeldomänenantikörpern

Die Radiomarkierung der sdAb EG2 und 7C12 mit  $^{99m}\text{Tc}$  basierte auf dem von Gainkam *et al.* [43] durchgeführten Protokoll. Zunächst erfolgte die Generierung des  $^{99m}\text{Tc}$ -Precursors  $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ . Hierfür wurde Pertechnetat ( $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ) frisch von einem  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ -Generator eluiert und vom Eluat bis zu 1,5 ml in einen  $^{99m}\text{Tc}$ -Tricarboxyl-Kit überführt. Dieser enthielt 4,5 mg Natriumboratcarbonat, 2,84 mg Natriumtetraborat-10  $\text{H}_2\text{O}$ , 8,5 mg Natriumtartrat-2  $\text{H}_2\text{O}$  und 7,15 mg Natriumcarbonat, pH 10,5.

Der Reaktionsansatz wurde für 20 min bei 100 °C gekocht, anschließend auf RT abgekühlt und der pH-Wert zwischen 7 und 8 mit 1 M HCl eingestellt. 100 µg EG2 bzw. 7C12 wurden mit Phosphatpuffer nach Sørensen, pH 5,4, und dem frisch hergestellten  $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$  versetzt. Die eingesetzten Volumina hingen dabei von der vorhandenen Radioaktivität ab. Der pH-Wert wurde nach dem Mischen nochmals überprüft. Dieser sollte weiterhin zwischen 7 und 8 liegen.

Die Radiomarkierung der sdAb erfolgte bei 60 °C und 800 rpm für 90 min im Thermomixer. Nachfolgend wurde mittels Radio-HPLC unter Verwendung einer RP18-Säule die Effizienz der Markierung überprüft. Als Laufmittel A diente ddH<sub>2</sub>O mit 0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure (TFA) und als Laufmittel B Acetonitril mit 0,1 % (v/v) TFA. Hierbei verlief der gewählte Gradient von 100 % Laufmittel A zu 100 % Laufmittel B innerhalb von 20 min. Um freies  ${}^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$  oder  $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$  aus der Probe zu entfernen, wurde eine Spinfiltration durchgeführt. Hierfür wurden Spinfilter mit einem MWCO von 5 kDa eingesetzt. Die Zentrifugation erfolgte für 20 min bei 25 °C und 13.000 x g.

Die Radiomarkierung erfolgte unter sauerstofffreien Bedingungen, sodass die jeweiligen Reaktionsansätze vor der Technetiummarkierung durch Tricarbonyl mit Argon gespült wurden.

### **3.8 *In-vitro*-Untersuchungen zur Zellbindung und Zellaufnahme**

Für die Untersuchung der EGFR-bindenden Eigenschaften der sdAb EG2 und 7C12 wurden Zellbindungsassays sowohl an lebenden als auch an fixierten A431- und FaDu-Zellen vergleichend durchgeführt.

#### **3.8.1 Zell-ELISA**

Für den Zell-ELISA wurden in 96-Well-Platten 5.000 Zellen in 200 µl Kultivierungsmedium ausgesät und ÜN unter Standardkultivierungsbedingungen kultiviert.

Am nächsten Tag wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 10 % (v/v) Formaldehyd in 1 x PBS für 1 h bei RT fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit 1 x PBS wurden die Welloberflächen mit 1 % BSA für 2 h bei RT blockiert. Anschließend wurden die Zellen mit EG2 bzw. 7C12 in unterschiedlichen Konzentrationen (0  $\mu$ M bis 3,35  $\mu$ M) für 1 h bei 37 °C inkubiert. Der Inkubation folgten fünf Waschschritte mit PBST. Für die Detektion wurden die Zellen anschließend mit einem mit Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) gekoppeltem anti-His<sub>6</sub> mAk (Takara Bio Europe/Clontech) für 1 h bei RT inkubiert. Dieser wurde in 5 % Milchpulver 1:5000 verdünnt. Nach weiteren drei Waschschritten wurden 100  $\mu$ l einer Luminol-Lösung in jedes Well pipettiert, 5 min bei RT inkubiert und nachfolgend im Microplate-Reader ausgelesen.

### 3.8.2 Assay zur Zellaufnahme

Dieser Assay wurde in 24-Well-Platten und Vierfachbestimmung durchgeführt. Pro Well wurden 1 x 10<sup>5</sup> Zellen in 1 ml Kultivierungsmedium ausgesät und über Nacht unter Standardkultivierungsbedingungen kultiviert.

Die Zellen wurden mit <sup>99m</sup>Tc-EG2 bzw. <sup>99m</sup>Tc-7C12 in unterschiedlichen Konzentrationen (0 nM bis 100 nM) für 1 h bei 37 °C inkubiert. Um die spezifische Bindung zu untersuchen, wurde je ein 50 nM - Ansatz entweder mit unmarkiertem sdAb oder C225 blockiert. Hierfür wurden den Zellen 5  $\mu$ M der entsprechenden Blockiersubstanz in 1 ml Medium zwei Stunden vor Inkubationsbeginn zugeführt. Der Inkubation folgten drei Waschschritte mit 1 x PBS. Zur Lyse der Zellen wurden anschließend in jedes Well 500  $\mu$ l einer 0,1 M NaOH-Lösung, versetzt mit 1 % SDS (w/v), pipettiert und für 30 min bei RT auf einem Schüttler inkubiert. 250  $\mu$ l des Lysats wurden für die Messung im  $\gamma$ -Counter und nach Abklingen der Aktivität für eine Proteinbestimmung verwendet. Als Standard dienten hierbei zehn Verdünnungen des jeweiligen radiomarkierten sdAb. Die Bestimmung des Proteingehalts diente der Korrelation mit der in jedem Well vorhandenen Zellzahl.

### 3.9 Immunfluoreszenz

Das Prinzip der Immunfluoreszenz basiert auf der spezifischen Bindung zwischen fluoreszenzmarkierten Antikörpern und den entsprechenden Antigenen und dient damit der Untersuchung der Lokalisation von Proteinen in Zellkompartimenten und Geweben. Dabei bietet die indirekte Methode den Vorteil einer höheren Sensitivität, indem fluoreszenzmarkierte sekundäre Antikörper eingesetzt werden, die spezifisch den primären Antikörper binden (Beutner, 1961). Die Arbeiten zur Immunfluoreszenz wurden von Frau Dr. Katja Zscheppang aus der Arbeitsgruppe „Molekulare und Zelluläre Radiobiologie“ des *National Center for Radiation Research in Oncology* (Dresden) durchgeführt.

#### *Ansatz und Fixierung*

Zunächst wurden A431-Zellen in 24-Well-Platten, die Coverslips enthielten, bis zu einer Konfluenz von 70 - 80 % unter Standardkultivierungsbedingungen kultiviert. Zur Untersuchung der Zellbindung der sdAb und Nanopartikelkonjugate wurden die Zellen mit dem jeweiligen Konstrukt für bis zu 6 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgenommen, die Zellen gewaschen und in 3%igem (v/v) Formaldehyd in PBS für 15 min fixiert. Nach diesem und jedem der folgenden Schritte wurden die Zellen dreimal mit PBS für 5 min gewaschen. Alle Inkubationsschritte erfolgten bei RT in einer Feuchtekammer.

#### *Färbung*

Für die Permeabilisierung der Zellen wurden diese für 10 min bei RT in PBS und 0,25 % (v/v) Triton X-100 inkubiert und gewaschen. Anschließend wurden unspezifische Antikörperbindungen durch Zugabe einer 1 % BSA-Lösung (w/v) blockiert, welche für 30 min die Zellen bedeckte. Dem schloss sich eine 2-stündige Inkubation mit dem primären Antikörper anti-EGFR (1:1000) an. Nach weiteren Waschschritten erfolgte die Inkubation mit den Sekundärantikörpern für 60 min.

Weiterhin wurden die Zellen mit Vectastain eingebettet, welches zusätzlich DAPI für die Färbung des Nucleus enthielt. Die gefärbten Proben wurden bis zur mikroskopischen Auswertung bei 4 °C gelagert.



## 4 Ergebnisse und Diskussion

Die frühzeitige Erkennung von Tumorerkrankungen trägt maßgeblich zum Behandlungserfolg bei, wobei mittlerweile durchschnittlich 50 % der Krebserkrankungen bei rechtzeitiger Diagnosestellung geheilt werden können. Insbesondere gilt dies für Tumore der Haut, der Brust, des Darms, des Gebärmutterhalses und der Prostata [58]. Neben dem Mammographiescreening (Röntgenuntersuchung), dem zytologischen (Papanicolaou-) Abstrich des *Cervix uteri* und der kolorektalen Endoskopie zielen Diagnostikverfahren hauptsächlich auf die Identifizierung von Tumor-assoziierten Molekülen ab, den sogenannten Biomarkern [59]. Um diese identifizieren zu können, werden unter anderem Biopsien zur Gewinnung von Zell- und Gewebeproben durchgeführt. Jedoch sind sie in der Anwendung bei schwer zugänglichen Tumoren limitiert und mit Unannehmlichkeiten, wie zum Beispiel Krankenhausaufenthalt, Schmerzen und Narben, für den Patienten verbunden, sodass nicht-invasive Bildgebungsverfahren auf Grundlage molekular wirksamer Radiopharmaka immer mehr in den Mittelpunkt verbesserter Diagnostikstrategien rücken [59-61]. Die Hauptklasse solcher Wirkstoffe bilden monoklonale Antikörper (mAk), die sich einerseits durch hohe Affinitäten auszeichnen, aber andererseits eine langsame Blut-Clearance und eine begrenzte Tumorgewebepenetration aufweisen, was sich auf die hohe Molekularmasse von rund 150 kDa zurückführen lässt [59]. Untersuchungen zur Wirksamkeit von Fab-Fragmenten und scFv verdeutlichten trotz verbesserter Tumor-zu-Hintergrund-Verhältnisse einige Nachteile kleinerer Antikörper-Fragmente wie geringere Affinitäten und Stabilitäten bei 37 °C im Vergleich zum Gesamtantikörper [25, 62]. Eine vielversprechende Möglichkeit, diese Nachteile zu überwinden, bietet die Anwendung Antigen-spezifischer Einzeldomänenantikörper (sdAb).

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei in der Literatur beschriebenen Vertreter der anti-EGFR sdAb heterolog exprimiert, charakterisiert und ihr Einsatz für die Konjugation mit Nanopartikeln untersucht.

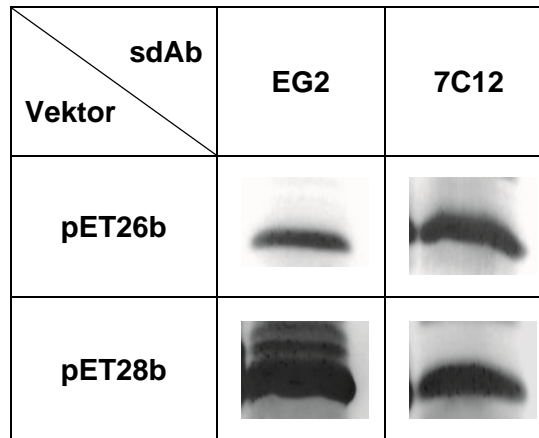
#### 4.1 Herstellung von Einzeldomänenantikörpern

Zur heterologen Expression der beiden sdAb 7C12 [43] und EG2 [44], die je eine intramolekulare Disulfidbrücke besitzen, wurde der kommerziell erhältliche *E. coli* Stamm SHuffle<sup>®</sup> T7 Express (ST7E) verwendet. Dieser Stamm verfügt im Gegensatz zu vielen anderen Expressionsstämmen über zwei wesentliche Modifikationen, welche die Ausbildung von Disulfidbrücken im Zytoplasma ermöglichen. Zum einen führt die Eliminierung der Enzyme Glutathion-Reduktase (*Δgor*) und Thioredoxin-Reduktase (*ΔtrxB*) zu oxidierenden Bedingungen im Zytoplasma, sodass Thioredoxine im oxidierten Zustand vorliegen und als Oxidasen wirken. Zum anderen wurde der Stamm dahingehend gentechnisch verändert, dass es zu einer Überexpression der Disulfidisomerase DsbC im selben Kompartiment kommt und dadurch rekombinante Proteine ihre korrekt gefaltete Konformation einnehmen. Außerdem erlaubt die Expression der T7 RNA-Polymerase ausgehend vom lac-Operon eine sehr genaue Kontrolle der Proteinexpression [63]. Die unerwünschte Degradation von Proteinen ist in diesem Expressionsstamm durch die Deletion der zytoplasmatischen Lon-Protease und der OmpT-Protease der äußeren Membran reduziert.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Expression im Periplasma und im Zytoplasma zunächst hinsichtlich Ausbeute, Proteolyse und Ausbildung der stabilisierenden Disulfidbrücken verglichen werden, um für den späteren Einsatz der Proteine für die Nanopartikelkonjugation eine ausreichende Menge korrekt gefalteter sdAb zur Verfügung zu haben. Daher erfolgte neben der Klonierung der kodierenden Sequenzen in pET28b für die zytoplasmatische Expression auch die Insertion in pET26b und die damit verbundene Fusion mit dem *pelB* Sekretionssignal, was den posttranslationalen Transport der rekombinanten Proteine ins Periplasma zum Ziel hatte. In beiden Fällen wurden die sdAb am C-Terminus mit einem poly-Histidin-Peptid zur Reinigung mittels Affinitätschromatographie und zur <sup>99m</sup>Tc-Markierung versehen.

Um die Expression der beiden sdAb EG2 und 7C12 zunächst innerhalb der beiden Zellkompartimente nachzuweisen, wurde der Expressionsstamm mit den entsprechenden Plasmiden transformiert. Nach erfolgter Induktion mittels 1 mM IPTG und Expression bei RT ÜN wurde die Bildung der sdAb mittels SDS-PAGE und WB überprüft

(Abbildung 7). In beiden Zellkompartimenten konnten die entsprechenden Zielproteine bei einer Größe von ca. 15 kDa detektiert werden. Im Fall von EG2 ist ein deutlicher Unterschied in der Stärke der Expression zwischen den beiden gewählten Kompartimenten zu erkennen, welches sich in einer intensiveren Bande entsprechend dem zytoplasmatisch exprimierten Protein äußerte. Der sdAb 7C12 hingegen schien gleichermaßen im Periplasma wie im Zytoplasma gebildet zu werden.



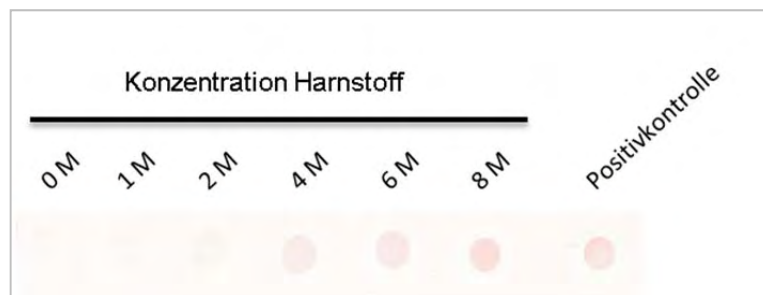
**Abbildung 7: Nachweis der periplasmatischen und zytoplasmatischen Expression der sdAb mittels Western Blot**

*E.coli* ST7E wurden mit den Vektoren pET26b oder pET28b, die jeweils die kodierenden Sequenzen für EG2 bzw. 7C12 enthielten, transformiert und kultiviert. Für den Nachweis der Expression wurden jeweils 1 ml Kulturproben zentrifugiert und die Pellets für die SDS-PAGE und WB verwendet. Die immunologische Detektion erfolgte mittels anti-His<sub>6</sub>-Antikörper.

#### 4.1.1 Periplasmatische Expression

Für die Herstellung der sdAb wurde zunächst die periplasmatische Expression gewählt, da die Sekretion aus der Bakterienzelle bereits zu einer Separation von anderen zytoplasmatisch lokalisierten Proteinen führt. Die Reinigung der sdAb erfolgte mittels immobilisierter Metallchelate-Affinitätschromatographie und zu deren Kontrolle wurde stets

eine SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Hierbei wurden vergleichsweise, neben den Elutionsfraktionen, die beiden Waschfraktionen und der Durchfluss aufgetragen. Dabei zeigte sich, dass sich die jeweiligen Zielproteine EG2 und 7C12 ausschließlich im Durchfluss befanden (nicht gezeigt). Ausgehend von diesen Beobachtungen entstand die Vermutung, dass die Faltung des nativen Proteins eine unzureichende Zugänglichkeit des poly-Histidin-Peptids zulässt und somit keine Interaktion zwischen dem *His60 Ni* Säulenmaterial und den Proteinen stattfinden kann [10]. Um dies zu überprüfen, wurde ein Dot-Blot durchgeführt. Als Ausgangsmaterial dienten hierbei Proben der sdAb, die mit unterschiedlichen Konzentrationen an Harnstoff versetzt wurden. In der Abbildung 8 ist der Blot beispielhaft für 7C12 dargestellt. Im Fall des nativen Proteins war keine Färbung erkennbar, welche jedoch mit steigender Harnstoffkonzentration zunahm. Dies deutet darauf hin, dass die Denaturierung des sdAb zu einer erhöhten Zugänglichkeit des poly-Histidin-Peptids führt. Eine Probe 7C12 wurde durch 5-minütiges Kochen vollständig denaturiert und diente als Positivkontrolle.

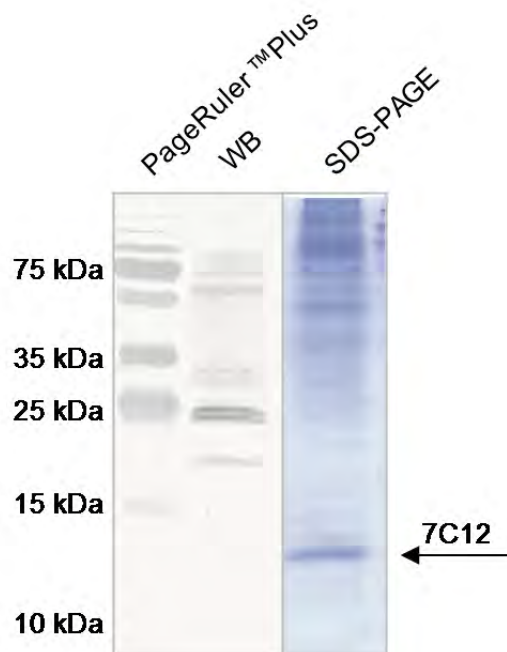


**Abbildung 8: Überprüfung der Zugänglichkeit des Affinitäts-Tags mittels Dot-Blot**

Proben des sdAb 7C12 wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen Harnstoff versetzt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Als Positivkontrolle wurde der sdAb durch 5-minütiges Kochen vollständig denaturiert. Mit dem Anstieg der Harnstoffkonzentration wird das poly-Histidin-Peptid zugänglich, was mit einer zunehmenden Färbung der Proben im Blot einhergeht. Die immunologische Detektion erfolgte mittels anti-His<sub>6</sub>-Antikörper.

Die Unzugänglichkeit des poly-Histidin-Peptids in nativ vorliegenden sdAb wurde anschließend im WB nochmals bestätigt. Hierfür wurden die periplasmatisch

exprimierten sdAb ohne die vorherige Reduktion mittels DTT und Kochen auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und separiert. Das Vorhandensein des nativen Proteins wurde durch Coomassie-Färbung des SDS-Gels demonstriert, jedoch war eine immunologische Detektion im WB nicht möglich (Abbildung 9). Dies bestätigt die Vermutung, dass das poly-Histidin-Peptid aufgrund der Faltung in den periplasmatisch exprimierten, nativ vorliegenden sdAb nicht zugänglich ist. Beide Versuche wurden ebenfalls mit EG2 durchgeführt und führten zu den gleichen Resultaten. Eine Reinigung der sdAb via IMAC wäre unter denaturierenden Bedingungen, durch die Zugabe von Harnstoff oder Guanidiniumhydrochlorid, und nachfolgender Renaturierung möglich. Jedoch sollte die Aufarbeitung so einfach wie möglich gehalten werden, sodass zur zytoplasmatischen Expression gewechselt wurde.

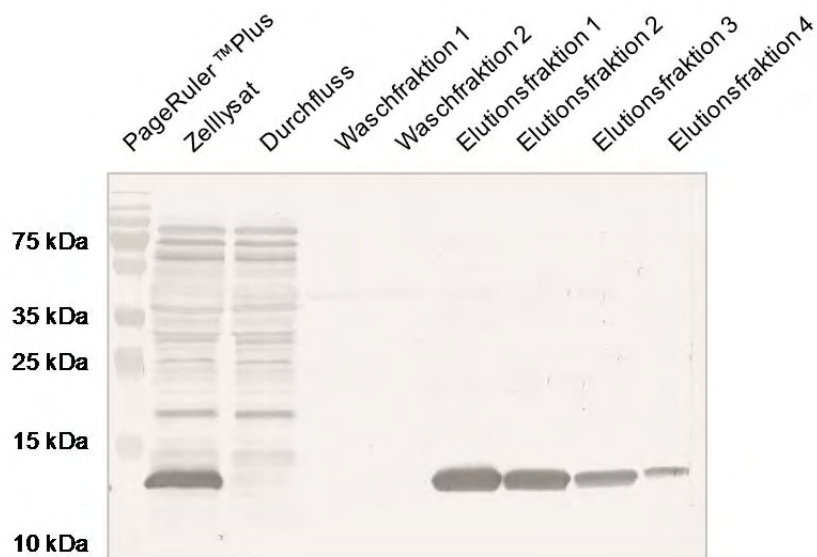


**Abbildung 9: Bestätigung der Unzugänglichkeit des poly-Histidin-Peptids**

Die Färbung des SDS-Gels mit Coomassie-Blau (Spur 3) bestätigt die Expression des Zielproteins 7C12. Jedoch war es nicht möglich, diesen in seiner nicht-reduzierten Form im WB via poly-Histidin-Peptid zu detektieren (Spur 2). Bei den höhermolekularen Banden im WB handelt es sich um zelluläre Proteine, die durch unspezifische Wechselwirkungen mit dem anti-His<sub>6</sub>-Antikörper ein falsch-positives Signal ergeben.

#### 4.1.2 Zytoplasmatische Expression

Um die Reinigung via poly-Histidin-Peptid gewährleisten zu können, wurden die zytoplasmatisch exprimierte sdAb zunächst in ihrer nicht-reduzierten Form in einer SDS-PAGE mit anschließendem WB und immunologischer Detektion hinsichtlich der Zugänglichkeit des Tags untersucht. Im Gegensatz zur Expression im Periplasma, konnten diesmal die heterolog exprimierte Proteine über das carboxyterminale poly-Histidin-Peptid detektiert werden (nicht gezeigt). Wie in Abbildung 10 beispielhaft für 7C12 zu erkennen, konnten beide sdAb anschließend gereinigt und isoliert werden. Weder der Durchfluss noch die Waschfraktionen enthielten nach zwei Chromatographie-Durchläufen das Zielprotein. Nach erfolgter Reinigung und Dialyse wurden beide Proteine aufkonzentriert und quantifiziert.



**Abbildung 10: Kontrolle der Reinigung des 7C12 mittels Western Blot**

Die immunologische Detektion erfolgte unter Verwendung des anti-His<sub>6</sub>-Antikörpers nach gelelektrophoretischer Separation verschiedener Fraktionen der Affinitätschromatographie. Der zytoplasmatisch exprimierte sdAb 7C12 konnte mittels *His60 Ni Superflow™ Gravity* Säulen gereinigt werden. Im Durchfluss und in den Waschfraktionen war kein Zielprotein detektierbar.

Die Ausbeuten der beiden sdAb in *E.coli* ST7E fielen trotz optimierter Codon-Usage sehr unterschiedlich aus. Dabei ist zu beachten, dass diese ohne jegliche Optimierung des Herstellungsprozesses erzielt wurden. Für 7C12 betrug die Ausbeute pro Liter Kulturmedium 4,2 mg und für EG2 25,0 mg, was publizierten Werten entspricht [39]. Höhere Proteinausbeuten könnten durch eine Anpassung der Kultivierungstemperatur, der Expressionsdauer oder des Sauerstoffeintrags erzielt werden [64, 65]. Weiterhin bieten sich Hefen, wie zum Beispiel *Pichia Pastoris* oder *Saccharomyces cerevisiae*, für eine Produktion im großen Maßstab an [40, 66, 67]. In einer 15 m<sup>3</sup>-Fermentation mit *S. cerevisiae* konnten hierbei bis zu 1,3 kg eines sdAb generiert werden, welcher spezifisch gegen den Azofarbstoff RR6 gerichtet ist [66]. Dennoch birgt die rekombinante Herstellung von therapeutisch nutzbaren Proteinen in Hefen auch Gefahren, da diese Organismen sekretierte Zielproteine mitunter in einer N-glykosylierten Form bilden [68, 69]. Dies kann zum Beispiel die Antigen-bindenden Eigenschaften negativ beeinflussen [70]. Ferner wird durch die Addition Hefespezifischer Oligosaccharide die Immunogenität der Proteine erhöht, sodass bei einer therapeutischen Anwendung unerwünschte Nebenwirkungen verstärkt werden [71].

## 4.2 Charakterisierung der Einzeldomänenantikörper

Die Molekularmasse der exprimierten sdAb von ca. 15 kDa wurde in einer SDS-PAGE, wie bereits gezeigt, überprüft. Weiterhin wurde der hydrodynamische Durchmesser beider sdAb mittels dynamischer Lichtstreuung im Malvern Zetasizer Nano ZS bestimmt. Dabei wiesen sie eine durchschnittliche Größe von 4 - 7 nm auf. Im Allgemeinen ist die Kristallstruktur eines sdAb durch einen Durchmesser von 2,5 nm und eine Länge von über 4 nm charakterisiert [67]. Dies macht sie besonders interessant für den Einsatz in bildgebenden Verfahren. Auf der einen Seite ermöglicht die geringe Größe eine schnelle Penetration ins Tumorgewebe. Auf der anderen Seite erfolgt eine schnelle Blut-Clearance, sodass hohe Tumor-zu-Hintergrund-Verhältnisse bereits eine Stunde nach der Injektion erzielt werden können [43]. Eine solch geringe Molekularmasse erweist sich im Allgemeinen aber auch als Nachteil, wenn sie

unterhalb des Nierenschwellenwerts liegt, welcher rund 60 kDa beträgt [72]. Die damit verbundene unspezifische Nierenakkumulation beruht auf elektrostatischen Interaktionen zwischen der negativ geladenen Oberfläche tubulärer Zellen und positiv geladenen Peptiden oder Proteinen, die zunächst im Glomerulus filtriert und anschließend von proximalen Tubuluszellen rückresorbiert werden [73]. Dieser Effekt sorgt unter anderem auch bei radiomarkierten sdAb für eine erhöhte Strahlenexposition der Niere [43, 59, 61]. Im Fall von  $^{90}\text{Y}$ -markierten Diabodies (~50 kDa) führte dies zum Beispiel zu irreparablen Nierenschäden in Mäusen, sodass jene ein Jahr später daran starben [74]. Um der Nephrotoxizität entgegenzuwirken und eine übermäßige Akkumulation eines Radiopharmakons zu vermeiden, wird dem Patienten vor der eigentlichen Behandlung eine Infusion mit basischen Aminosäuren verabreicht [75, 76].

#### *Ausbildung der Disulfidbrücken*

Die Expression Disulfidbrücken-haltiger Proteine in *E. coli* erfolgt üblicherweise im Periplasma. Genetische Modifikationen im hier verwendeten Expressionsstamm ermöglichen jedoch deren Bildung innerhalb des Zytoplasmas. Um die korrekte Ausbildung der für die Stabilität und Funktionalität wichtigen Disulfidbrücken innerhalb der sdAb zu bestätigen, wurde ein Nachweis für Cystein in Dreifachbestimmung durchgeführt. Die entsprechenden gemessenen Extinktionen sind der Tabelle 8 zu entnehmen, wobei die Berechnung des Anteils der oxidierten Form auf der Gleichung (1) beruhte. Es zeigte sich, dass EG2 zu 83 %  $\pm$  2 % und 7C12 zu 97 %  $\pm$  3 % in der oxidierten Form vorliegen. Die Bildungsrate von Disulfidbrücken ist unter anderem abhängig von der räumlichen Nähe, in der sich die beteiligten Cystein-Reste befinden [77]. Da sich jedoch die Cysteine innerhalb der Aminosäure-Sequenzen der sdAb jeweils nur um eine Position unterscheiden, scheint dies keine Ursache für die differierenden Ergebnisse zu sein. Da 7C12 im Vergleich zu EG2 schwächer exprimiert wird, dessen Sulfhydrylgruppen aber fast vollständig oxidiert vorliegen, scheint ein Zusammenhang zwischen der Expressionsrate und der Ausbildung der intramolekularen Disulfidbrücken zu bestehen. Offenbar reicht die Menge an oxidierten Thioredoxinen bei der starken Expression von EG2 nicht aus, um dessen Sulfhydrylgruppen vollständig zu oxidieren.



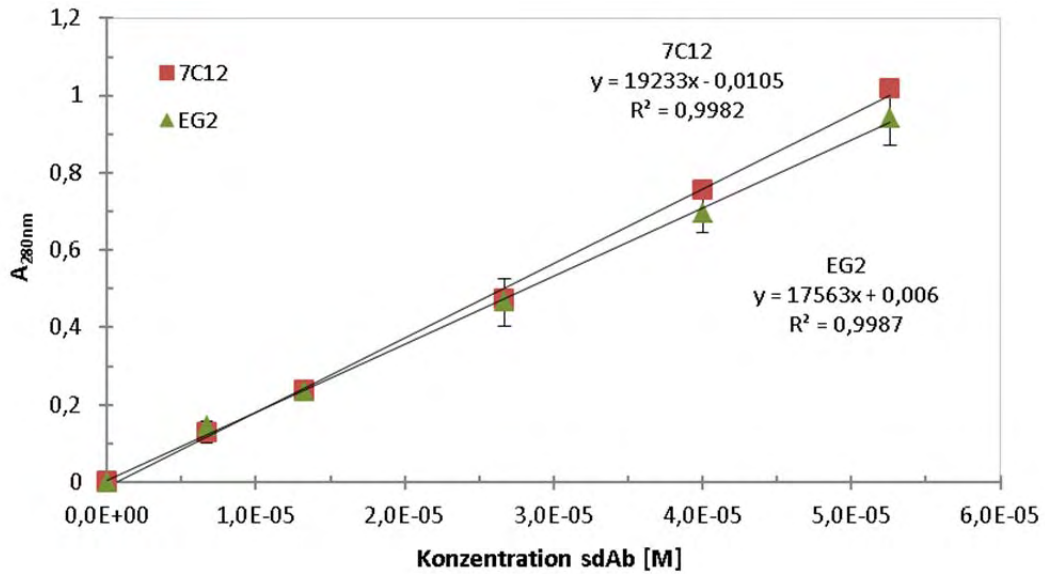
**Tabelle 8: Bestimmung der Ausbildung von Disulfidbrücken in sdAb**

Die Ausbildung der Disulfidbrücken innerhalb der zytoplasmatisch exprimierten sdAb EG2 und 7C12 wurde mittels Ellman's Reagenz in einer Dreifachbestimmung überprüft. Hierfür wurden die sdAb jeweils in oxidiertes und reduziertes Form mit dem Reagenz inkubiert und die Absorption photometrisch bei 412 nm vermessen.

EG2			7C12		
$A_{412\text{nm}}(S_{\text{ox}})$	$A_{412\text{nm}}(S_{\text{red}})$	oxidierte Form [%]	$A_{412\text{nm}}(S_{\text{ox}})$	$A_{412\text{nm}}(S_{\text{red}})$	oxidierte Form [%]
0,054	0,277	<b>81</b>	0,002	0,034	<b>94</b>
0,067	0,441	<b>85</b>	0,003	0,238	<b>99</b>
0,075	0,454	<b>83</b>	0,002	0,086	<b>98</b>

*Bestimmung der Extinktionskoeffizienten*

Weiterhin wurden die Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$  der sdAb in 1 x PBS experimentell mittels UV-VIS-Spektroskopie bestimmt, um den Proteingehalt konjugierter Nanopartikel bestimmen zu können. Hierfür wurden Proben der sdAb mit einer definierten Proteinkonzentration bei 280 nm analysiert und der entsprechende  $\epsilon$  mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes ermittelt (Abbildung 11). Für EG2 und 7C12 ergaben sich Extinktionskoeffizienten von  $17.392 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  bzw.  $19.233 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  in 1 x PBS.



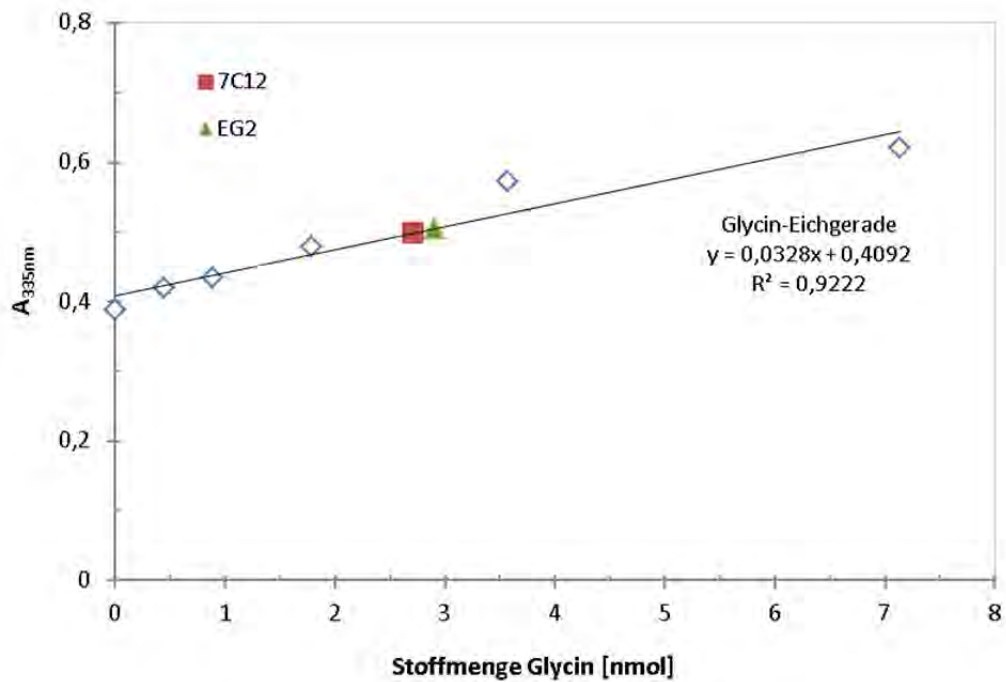
**Abbildung 11: Experimentelle Bestimmung der Extinktionskoeffizienten der sdAb**

Die Extinktionskoeffizienten von EG2 und 7C12 wurden in 1 x PBS ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Extinktionen (280 nm) und Standardabweichungen, die aus drei voneinander unabhängigen Experimenten ermittelt wurden.

#### *Quantitative Bestimmung freier Aminogruppen*

Die Konjugation der PMMA-Nanopartikel mit den Einzeldomänenantikörpern basiert auf der Ausbildung von Peptidbindungen zwischen beiden Reaktionspartnern. Um dies zu erzielen, wurde zunächst die Konzentration freier Aminogruppen innerhalb der sdAb ermittelt. Dieses Verfahren beruht auf der Reaktion von Trinitrobenzensulfonsäure (TNBS) mit primären Aminen und die Bildung eines orangefarbenen Farbkomplexes, dessen Konzentration photometrisch bei 335 nm im Spektrometer gemessen werden kann. Mit Hilfe der erhaltenen Extinktionen und einer Glycin-Eichgerade wurde anschließend die Stoffmenge der Aminogruppen in den analysierten Proben bestimmt, die 18 µg des jeweiligen sdAb enthielten (Abbildung 12). Für 7C12 und EG2 ergaben sich 150 µmol bzw. 160 µmol Glycinäquivalente pro mg natives Protein. Der geringe

Unterschied im Gehalt freier Aminogruppen lässt sich auf die Anzahl der Lysin-Reste innerhalb der sdAb zurückführen. Während pro EG2-Molekül sechs Lysine vorhanden sind, sind es pro 7C12-Molekül lediglich fünf. Denaturierte Proben der beiden sdAb wurden nicht mitgeführt, da die Nanopartikel-Konjugation unter nativen Bedingungen erfolgte und somit nur die zugänglichen Aminogruppen im nativen Zustand von Interesse waren.



**Abbildung 12: Quantitative Bestimmung freier Aminogruppen**

Dargestellt ist die gemessene Extinktion des Glycin-Standards in Abhängigkeit von der eingesetzten Stoffmenge. Weiterhin sind die Extinktionen der analysierten Proteinproben eingezeichnet, die jeweils 18 µg EG2 bzw. 7C12 enthielten.

### 4.3 Radiomarkierung der Einzeldomänenantikörper

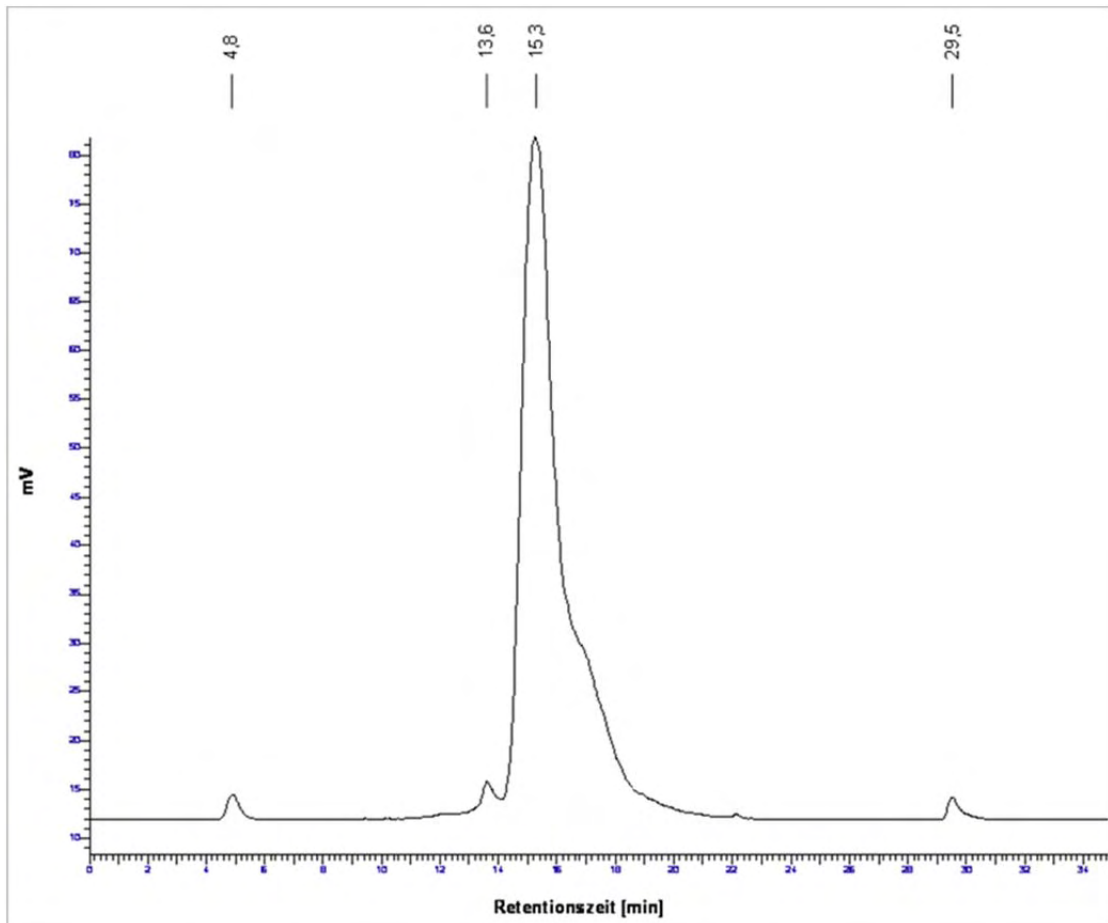
Radioaktiv markierte Proteine und Peptide finden unter anderem Verwendung in der Positronen-Emissions- bzw. Einzelphotonen-Emissions-Computertomographie und dienen damit der Bildgebung während der Diagnostik und Therapie. Aufgrund der guten Verfügbarkeit von  $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Generatorsystemen und einer Photonenenergie von 140 keV kommt hierbei das Radioisotop  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  verstärkt zum Einsatz [78]. Um eine spätere Anwendung der sdAb für bildgebende Verfahren zu ermöglichen, sollten diese zunächst mit  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  markiert werden.

Die sdAb wurden hierfür in einer 90-minütigen Reaktion bei 60 °C mit dem radioaktiven Precursor [ $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3$ ]<sup>+</sup> nach Literaturangabe umgesetzt [43]. Weiterhin erfolgte die Analyse des Reaktionsansatzes mittels Radio-HPLC, wobei unter den gewählten chromatographischen Bedingungen der  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -markierte EG2, wie in Abbildung 13 dargestellt, eine Retentionszeit von 15,3 min aufwies. Zudem war noch eine geringe Menge an Precursor enthalten, welcher bereits nach ca. 5 min eluierte. Aus dem Ansatz wurde dieser durch Spinfiltration entfernt. Zudem waren noch zwei kleinere Peaks nach 13,6 und 29,5 min zu erkennen, die auf geringe Verunreinigungen hinweisen. Die durch Integration der Peakflächen ermittelte radiochemische Reinheit des  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -EG2 betrug 97 %.

$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -7C12 zeigte ebenfalls eine Retentionszeit von 15 min und auch in diesem Reaktionsansatz war der Precursor in geringen Mengen vorhanden, welcher mittels Spinfiltration abgetrennt wurde. Die radiochemische Reinheit betrug hierbei 90 %.

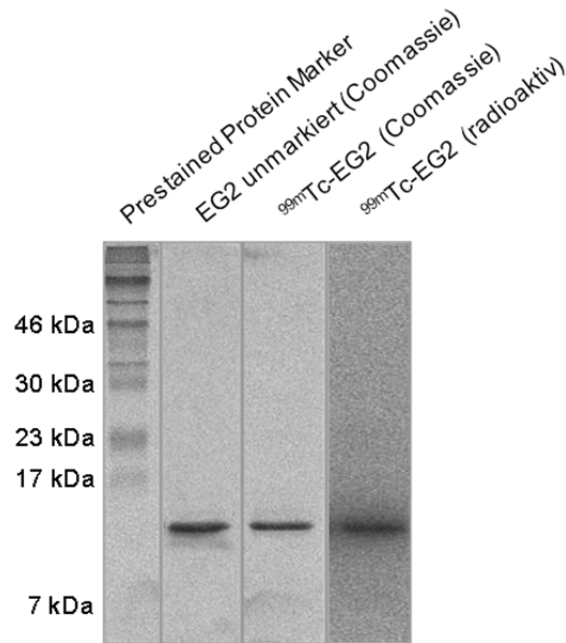
Um die radiochemische Reinheit und die Stabilität der Proteine nach der Radiomarkierung zu überprüfen, wurden diese im Anschluss in einer SDS-PAGE separiert. Zum Vergleich diente der unmarkierte sdAb, welcher neben dem markierten sdAb nach dem Gellauf mittels Coomassie-Färbung nachgewiesen wurde. In der Abbildung 14 ist das dazugehörige SDS-Gel des  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -EG2 gezeigt. Die Detektion der radiomarkierten Proteine erfolgte im Radioluminographie-Scanner. Im Vergleich zur Radio-HPLC waren nach der Gelelektrophorese keine Verunreinigungen zu erkennen. Des Weiteren konnte die Stabilität des sdAb nach einer 90-minütigen Inkubation bei 60 °C demonstriert werden, welcher weiterhin das erforderliche MW von rund 15 kDa

aufwies. Die Stabilität der sdAb auch bei höheren Temperaturen ist ein weiterer Vorteil gegenüber konventionellen Antikörpern. Da die kleinen Antikörperfragmente während der Hitzedenaturierung bei 80 - 92 °C anscheinend nicht aggregieren, ist eine Rückfaltung in die native Konformation möglich, sodass Antigen-bindende Eigenschaften erhalten bleiben [79-81].



**Abbildung 13: Radio-HPLC des  $^{99m}\text{Tc}$ -EG2 (Bedingungen S. 46)**

Chromatogramm nach der Radio-HPLC des  $^{99m}\text{Tc}$ -markierten Einzeldomänenantikörpers EG2. Die Retentionszeit des radiomarkierten EG2 betrug 15,3 min. Weiterhin war freies  $^{99m}\text{Tc}$ -Tricarbonyl im Reaktionsansatz enthalten, welches bereits nach 5 min eluierte. Die Reinheit des  $^{99m}\text{Tc}$ -EG2 war größer 95 %.



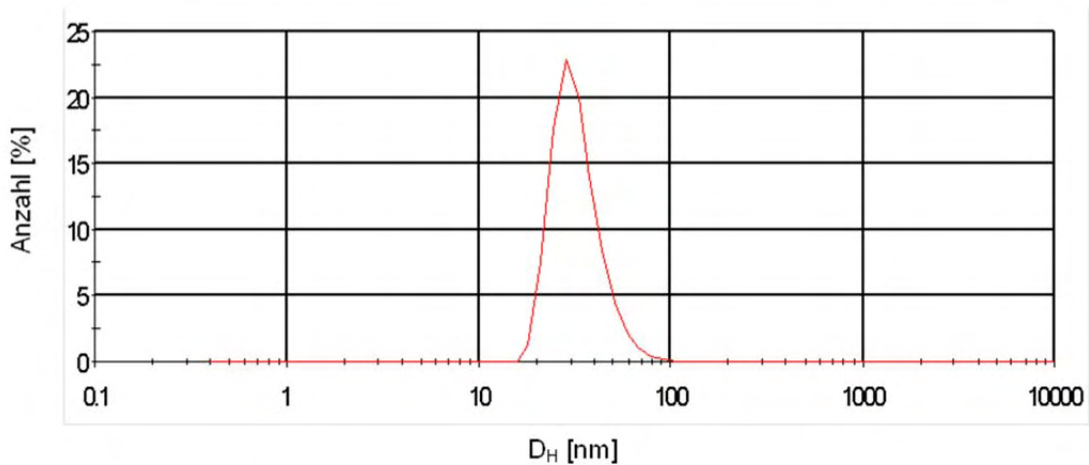
**Abbildung 14: SDS-PAGE zur Überprüfung der Stabilität des EG2 während der Radiomarkierung**

Die gelelektrophoretische Separation von unmarkiertem und radiomarkiertem EG2 resultiert in einer einzigen Bande entsprechend der kalkulierten Molekularmasse des Einzeldomänenantikörpers. Mittels Radioluminographie-Scanner konnte die radioaktiv markierte Probe detektiert werden (Spur 4). Die Färbung der sdAb erfolgte anschließend mit Roti<sup>®</sup>-Blue (Spur 2/3). Es konnten weder Abbauprodukte noch Unreinheiten innerhalb der Proben identifiziert werden.

#### 4.4 Charakterisierung der Nanopartikelkonjugate

In der vorliegenden Arbeit wurden kommerziell erhältliche fluoreszente Nanopartikel (NP) aus Polymethylmethacrylat (PMMA) mit Carboxylgruppen als Oberflächenfunktionalisierung für die Konjugation mit den Einzeldomänenantikörpern verwendet. Diese sollten laut Hersteller einen Durchmesser von 25 nm aufweisen. Um dies zu überprüfen, wurden die unmodifizierten NP zunächst mittels Dynamischer Lichtstreuung (DLS) untersucht. Der ermittelte hydrodynamische Durchmesser ( $D_H$ )

betrug  $32,9 \text{ nm} \pm 10,3 \text{ nm}$  (Abbildung 15). Trotz dieser Abweichung von mehr als 25 % wurden die NP für die Konjugationsversuche verwendet, da sie in größeren Mengen mit gleichbleibender Qualität verfügbar sind. Außerdem sollte prinzipiell gezeigt werden, dass sich die Einzeldomänenantikörper als zielsuchende Struktur auf der NP-Oberfläche für das Tumor-Targeting eignen.



**Abbildung 15: PMMA-Nanopartikelgrößenverteilung**

Die unmodifizierten PMMA-Nanopartikel wurden hinsichtlich ihres hydrodynamischen Volumens ( $D_H$ ) mittels DLS untersucht. Der ermittelte  $D_H$  der Partikel betrug  $32,9 \text{ nm} \pm 10,3 \text{ nm}$ .

Die Konjugation der fluoreszenten NP und sdAb basierte auf Grundlage der EDC/sulfo-NHS-Reaktion zur Aktivierung und Kupplung der Carboxylgruppen an der NP-Oberfläche mit primären Aminen der sdAb. Im Anschluss an die Kupplungsreaktion erfolgte die Bestimmung des Proteingehalts der NP-sdAb-Konjugate. Diese ergab, dass die konjugierten Proben  $200 \mu\text{g}$  EG2 bzw.  $250 \mu\text{g}$  7C12 pro Milligramm Partikel enthielten. Im Vergleich zu den Herstellerangaben zur Bindungskapazität, die 300 bis 800 ng pro Milligramm NP beträgt, fielen die ermittelten Proteinkonzentrationen sehr hoch aus. Dabei ist zu beachten, dass die Herstellerangaben von der Molekularmasse der eingesetzten Proteine abhängig sind. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass mit der NP-Oberfläche assoziierte sdAb die Proteinbestimmung verfälschen könnten. Eine diesbezügliche Untersuchung der NP-sdAb-Konjugate mittels SDS-PAGE zeigte, dass trotz mehrerer Waschschrte nach der Kupplungsreaktion noch immer Monomere enthalten waren (nicht gezeigt). Dies könnte erklären, warum der Proteingehalt viel

höher ausfiel als die maximal mögliche Bindungskapazität der NP. Um die Monomere vollständig zu entfernen, sollten alternative Methoden, wie zum Beispiel Gel-Permeations-Chromatographie, unter Berücksichtigung der Gesamtgröße der Konjugate in Betracht gezogen werden [82, 83]. Eine sehr zeitintensive, aber effiziente Methode nutzten Pitek *et al.* [84] zur Trennung von ungebundenem Transferrin und NP-Transferrin-Konjugaten. Die Wissenschaftler dialysierten die Proben für 98 h gegen 1 x PBS und konnten anschließend kein freies Protein mehr detektieren.

Zur weiteren Charakterisierung der NP-sdAb-Konjugate wurden diese ebenfalls im Malvern Zetasizer Nano ZS analysiert. Eine entsprechende Auswahl der Daten ist der Tabelle 9 zu entnehmen. Die starke Zunahme des Zetapotentials und die geringen Änderungen der PDI der jeweiligen Proben deuten auf eine Bindung der sdAb an die Oberfläche der NP hin. Die PDI sind jeweils  $< 0,2$ , sodass es sich um annähernd monodisperse Lösungen handelt. Jedoch konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den hydrodynamischen Durchmessern beobachtet werden. Innerhalb der Probe, die 7C12-NP-Konjugate enthielt, konnte lediglich ein Trend in der Zunahme des Durchmessers festgestellt werden. Sukhanova *et al.* [83] berichteten von ähnlichen Beobachtungen. Die Bindung eines CEA (Carcinoembryonales Antigen)-spezifischen sdAb an Quantum Dots führte lediglich zu einer minimalen Veränderung des Durchmessers. Die unmodifizierten Quantum Dots besaßen einen  $D_H$  von  $8,8 \text{ nm} \pm 2,9 \text{ nm}$ , wohingegen der  $D_H$  der Konjugate  $11,9 \text{ nm} \pm 2,9 \text{ nm}$  betrug. Das lässt vermuten, dass die geringe Größe der sdAb im gewählten Größenbereich der NP keinen wesentlichen Einfluss auf den hydrodynamischen Durchmesser der Konjugate hat.

**Tabelle 9: DLS Analyse unmodifizierter und mit sdAb beschichteter PMMA-Nanopartikel (NP) in PBS (pH 7,4) bei 25 °C**

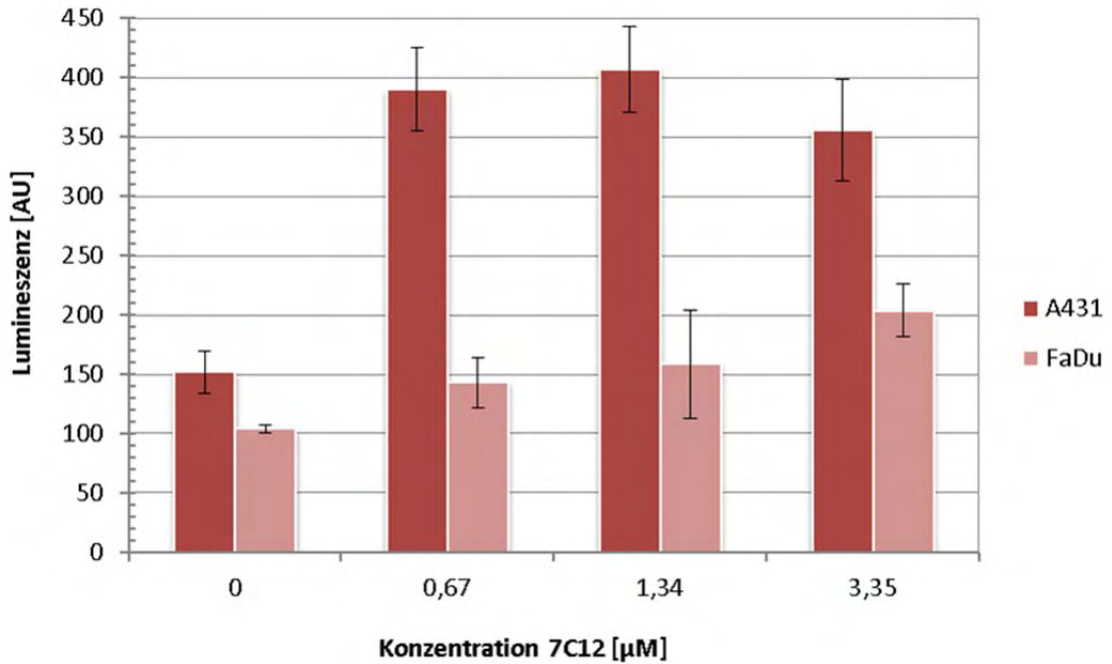
Probe	$D_H$ [nm]	PDI	Zetapotential [mV]	csdAb [ $\mu\text{g}/\text{mg}$ NP]
NP	$32,9 \pm 10,3$	0,121	$-53,0 \pm 11,3$	---
EG2-NP	$31,5 \pm 10,5$	0,167	$-17,2 \pm 9,9$	200
7C12-NP	$38,1 \pm 12,0$	0,161	$-3,7 \pm 7,4$	250



## **4.5 Untersuchung der EGFR-Bindungseigenschaften der Einzeldomänenantikörper und Nanopartikelkonjugate**

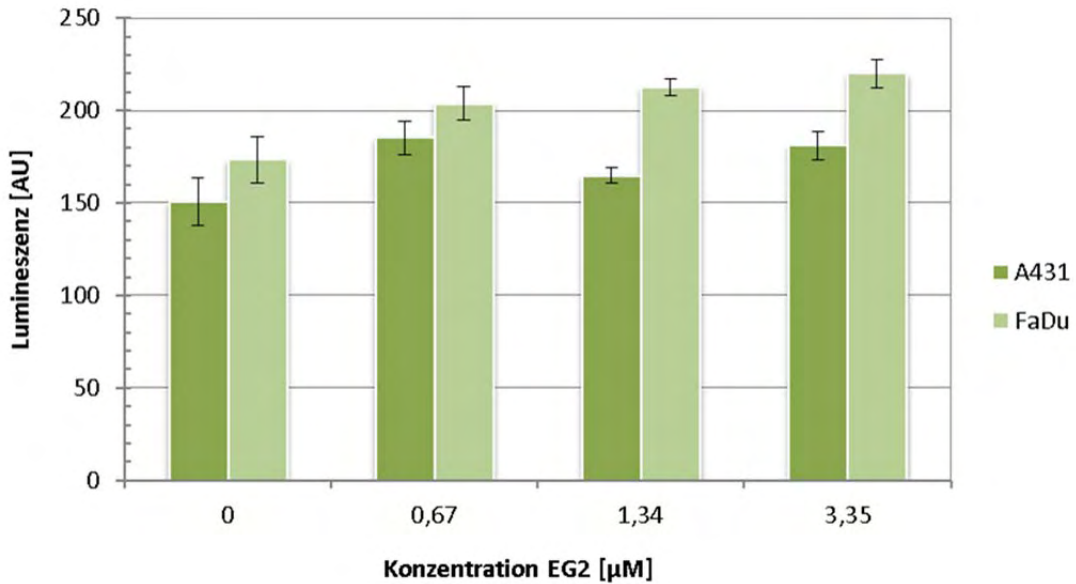
### **4.5.1 Untersuchung der Bindungsfähigkeiten der Einzeldomänenantikörper mit Hilfe von *In-vitro*-Bindungsassays**

Zunächst wurde im Zell-ELISA die Bindung der sdAb EG2 und 7C12 an die humanen Zelllinien A431 und FaDu überprüft. Die Detektion basierte hierbei auf der Messung der Lumineszenz, die während der enzymatischen Umsetzung von Luminol durch einen HRP-gekoppelten anti-His<sub>6</sub>-Antikörper entsteht. In den Abbildungen 17 und 18 ist jeweils die gemessene Lumineszenz in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration an 7C12 bzw. EG2 dargestellt. Besonders auffällig waren die hohen Hintergrundsignale zwischen 100 und 170 AU, welche durch unspezifische Wechselwirkungen des anti-His<sub>6</sub>-Antikörpers verursacht wurden. Dennoch waren deutliche Unterschiede in der Signalstärke zu erkennen; sowohl zwischen den behandelten Zelllinien als auch zwischen den beiden sdAb. Die mit 7C12 behandelten A431-Zellen verursachten eine Lumineszenz zwischen 350 und 410 AU. Die zu messende Lumineszenz behandelter FaDu-Zellen fiel hingegen um die Hälfte geringer aus. Im Fall des EG2 war ein gegenteiliger Trend zu beobachten. Jedoch lagen die Messsignale rund 40 % unterhalb der Signale, welche für den 7C12 erhalten wurden. Obwohl steigende Konzentrationen an EG2 und 7C12 eingesetzt wurden, war kein signifikanter Unterschied zwischen den gemessenen Lumineszenzen erkennbar. Dies deutet daraufhin, dass die EGF-Rezeptoren der Zellen und damit die Bindungsstellen für die Fragmente bereits gesättigt waren. Aus diesem Grund wurden für die Untersuchungen zur Zellaufnahme geringere Konzentrationen gewählt.



**Abbildung 17: Zell-ELISA mit 7C12**

Der Assay basierte auf der Messung der Lumineszenz in Abhängigkeit verschiedener Konzentrationen an 7C12, mit denen A431- und FaDu-Zellen inkubiert wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen, deren Berechnung auf Grundlage einer Vierfachbestimmung erfolgte.



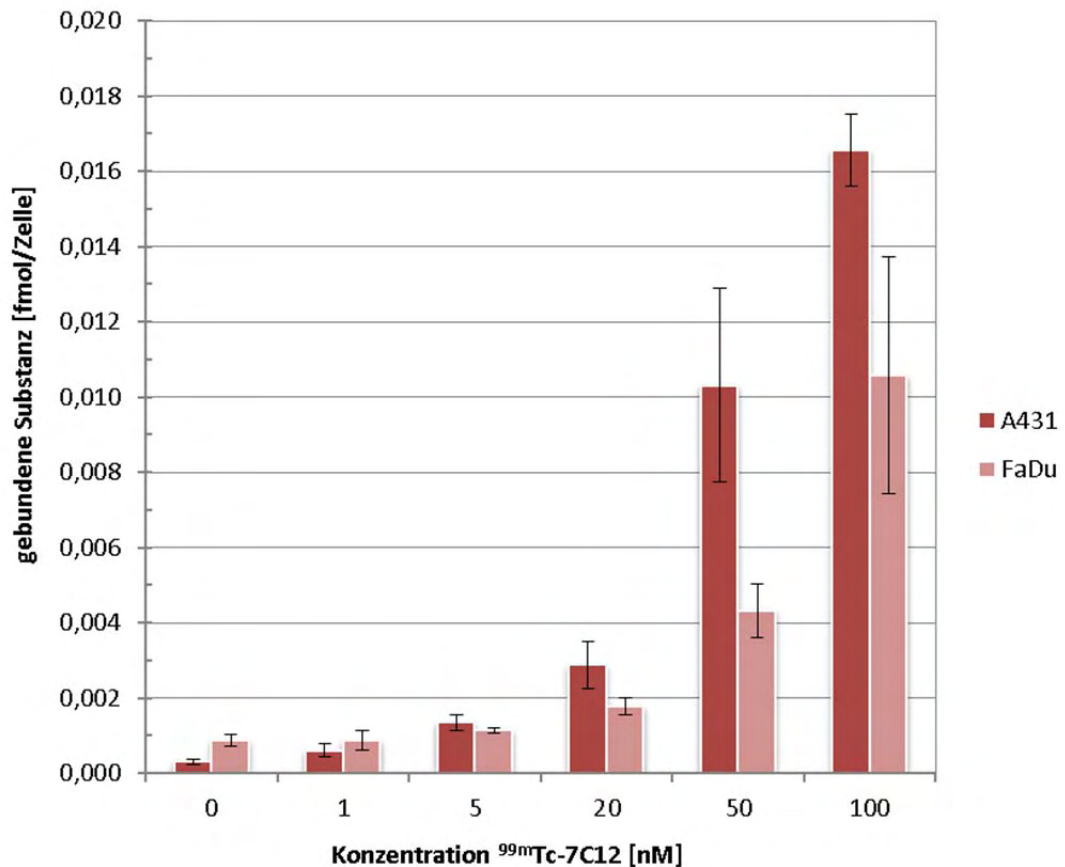
**Abbildung 16: Zell-ELISA mit EG2**

Der Assay basierte auf der Messung der Lumineszenz in Abhängigkeit verschiedener Konzentrationen an EG2, mit denen A431- und FaDu-Zellen inkubiert wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen, deren Berechnung ebenfalls auf Grundlage einer Vierfachbestimmung erfolgte.

*Zellaufnahme in vitale humane Tumorzelllinien*

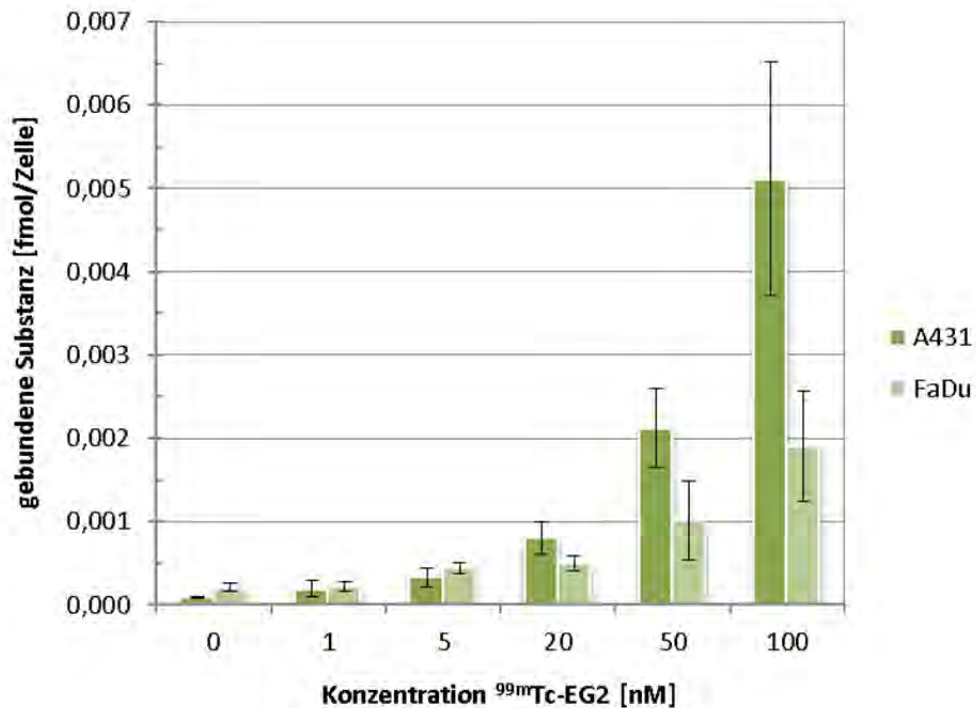
Die Untersuchungen zu den Bindungseigenschaften der  $^{99m}\text{Tc}$ -markierten sdAb erfolgten an vitalen Zellen. Hierfür wurden die Mengen an gebundenen Antikörperfragmenten pro Zelle in Abhängigkeit der jeweils eingesetzten Konzentration ermittelt und graphisch dargestellt. Wie den zwei nachfolgenden Abbildungen zu entnehmen ist, binden EG2 und 7C12 sowohl an A431- als auch an FaDu-Zellen. Mit steigender Konzentration der radiomarkierten sdAb nahm die Zahl gebundener Moleküle pro Zelle zu, wobei es deutliche Unterschiede zwischen den beiden Einzeldomänenantikörpern gab. Während zum Beispiel bei einer eingesetzten Konzentration von 100 nM  $^{99m}\text{Tc}$ -EG2 0,005 fmol pro A431-Zelle gebunden haben, wurden für den  $^{99m}\text{Tc}$ -7C12 0,016 fmol pro A431-Zelle ermittelt. Diese Differenzen lassen sich auf die unterschiedlichen Affinitäten der Fragmente zurückführen. Der  $K_d$ -Wert von 7C12 für EGFR beträgt 3,67 nM [61]. Damit ist dieser affiner als EG2, welcher einen  $K_d$ -Wert von 55 nM besitzt [26, 61]. Weiterhin wurden Unterschiede in der Menge an gebundener Substanz in Abhängigkeit von der gewählten Zelllinie deutlich. Der Trend aus dem Zell-ELISA, dass EG2 verstärkt an FaDu-Zellen bindet, konnte nicht bestätigt werden. Im Zell-ELISA erfolgte die Detektion der gebundenen sdAb unter Verwendung eines sekundären Antikörpers, der das poly-Histidin-Peptid erkennt und bindet. Jedoch können auch unspezifische Bindungen an Histidin-reiche Zelloberflächenproteine Staufftreten, die dann zu verfälschten Ergebnissen führen. Im hier durchgeführten Versuch wurden unabhängig von den jeweiligen sdAb durch A431-Zellen, verglichen mit FaDu-Zellen, mehr Antikörperfragmente pro Zelle gebunden. Diese Unterschiede korrelieren mit dem variierenden Rezeptorbesatz beider Zelllinien, welcher sich etwa um eine Größenordnung unterscheidet [59]. Die Rezeptordichte der A431-Zellen beträgt rund  $2 \cdot 10^6$  und die der FaDu-Zellen  $3,08 \cdot 10^5$  EGFR-Moleküle pro Zelle [85-87]. Dass der Unterschied im Expressionsprofil verschiedener Tumore durch EGFR-spezifische Antikörperfragmente verdeutlicht wird, macht sie für den Einsatz in bildgebenden Verfahren während der Krebstherapie interessant. Denn so können Veränderungen in der Rezeptordichte und der damit verbundene Behandlungsfortschritt visuell verfolgt werden [59]. Im Gegensatz dazu zeigte die Anwendung von  $^{99m}\text{Tc}$ -markiertem EGF keinen Unterschied in der Akkumulation des Tracers zwischen Tumoren mit verschieden starker EGFR-Expression [88, 89]. Zudem bewiesen Gainkam *et al.* [43] in *In-vivo*-Untersuchungen an männlichen Nacktmäusen, dass bereits eine Stunde nach

der Injektion (p.i.) von  $^{99m}\text{Tc}$ -markierten anti-EGFR sdAb im SPECT/micro-CT hohe Tumor-zu-Hintergrund-Verhältnisse erzielt werden. Dies stellt einen weiteren Vorzug gegenüber mAk dar, bei denen es 16 bis 24 h p.i. dauert, ehe die Bildgebung erfolgen kann [4, 90].



**Abbildung 18: Zellbindung von  $^{99m}\text{Tc}$ -7C12 an vitale Zellen**

Dargestellt ist die Menge an gebundenem  $^{99m}\text{Tc}$ -7C12 pro Zelle in Abhängigkeit von der Konzentration, mit der sowohl A431- als auch FaDu-Zellen für 1 h bei 37 °C inkubiert wurden. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen der Mittelwerte einer Vierfachbestimmung.

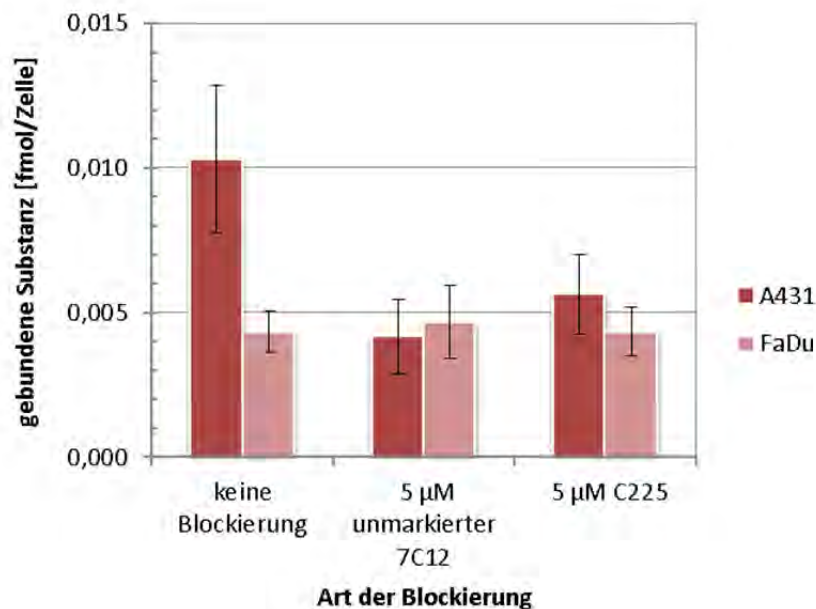


**Abbildung 19: Zellbindung von <sup>99m</sup>Tc-EG2 an vitale Zellen**

Dargestellt ist die Menge an gebundenem <sup>99m</sup>Tc-EG2 pro Zelle in der Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen der Mittelwerte einer Vierfachbestimmung.

Für erste Untersuchungen zur spezifischen und unspezifischen Bindung der Einzeldomänenantikörper wurden die Bindungsstellen der radiomarkierten sdAb mit C225 oder dem jeweiligen unmarkierten sdAb blockiert. Dies führte im Fall des <sup>99m</sup>Tc-7C12 zu einer Reduzierung zwischen 45 und 60 % der Bindung an A431-Zellen, wobei es keinen signifikanten Unterschied zwischen der Blockierung mit C225 und „kaltem“ 7C12 gab (Abbildung 20). Gründe dafür, dass der radiomarkierte 7C12 trotz Blockierung bindet, können zum einen sein, dass der 100-fache Überschuss an „kaltem“ 7C12 nicht ausreicht, alle Bindungsstellen vollständig zu blockieren. Zum anderen können unspezifische Bindungen an andere Zelloberflächenproteine eine Rolle spielen. Die kompetitive Bindung von 7C12 und C225 deutet auf sich

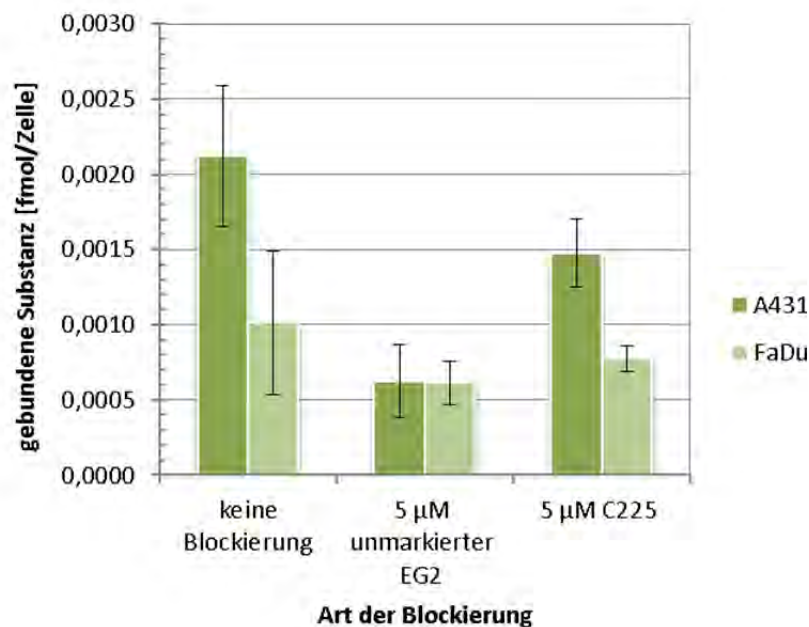
überlappende Epitope beider Antigen-bindenden Einheiten hin, wobei auch hier die Bindungsstellen des 7C12 nicht vollständig blockiert wurden. Gainkam *et al.* [43] erzielten in ihren *In-vitro*-Untersuchungen eine nahezu vollständige Blockade der Bindungsstellen für  $^{99m}\text{Tc}$ -7C12 durch die Inkubation mit C225 und „kaltem“ 7C12. Im Unterschied zu der vorliegenden Arbeit wurde jedoch jeweils mit einem 1000-fachen Überschuss gearbeitet. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass im vorliegenden Fall freie Bindungsstellen vorhanden sind und dementsprechend die Bindung des  $^{99m}\text{Tc}$ -7C12 erfolgte. In Bezug auf die FaDu-Zellen konnte keine Veränderung im Bindungsverhalten beobachtet werden. Da dieses Ergebnis nicht erklärbar und so in der Literatur auch nicht beschrieben ist, sollte das Blockierungsexperiment mit dieser Zelllinie unbedingt wiederholt werden.



**Abbildung 20: Untersuchungen zur spezifischen Bindung des sdAb 7C12**

Die A431- und FaDu-Zellen wurden 2 h vor der Inkubation mit  $^{99m}\text{Tc}$ -7C12 vergleichsweise mit unmarkiertem 7C12 oder C225 inkubiert, um Bindungsstellen zu blockieren. Dargestellt ist die Menge an gebundener Substanz pro Zelle in Abhängigkeit von der Art der Blockierung. Die Fehlerbalken entsprechen dabei den Standardabweichungen der Mittelwerte einer Vierfachbestimmung.

Die Untersuchungen zur Spezifität der Bindung des EG2 führten zu abweichenden Ergebnissen. Während die Blockierung der Bindungsstellen der A431-Zellen mit einem 100-fachen Überschuss an „kaltem“ EG2 zu einer Reduzierung der Bindung des  $^{99m}\text{Tc}$ -EG2 um 70 % zur Folge hatte, wurden die Epitope durch C225 nur geringfügig besetzt, sodass keine signifikante Bindungsinhibierung festgestellt wurde (Abbildung 21). Dies deutet daraufhin, dass sich die Bindungsstellen am EGFR für EG2 und C225 unterscheiden. Die Blockierung der Epitope der FaDu-Zellen hingegen zeigte ebenfalls keine großen Unterschiede zwischen dem sdAb und C225. Auch hier wird eine Wiederholung des Blockierungsexperiments zur Absicherung dieser Resultate vorgeschlagen.



**Abbildung 21: Untersuchungen zur spezifischen Bindung des sdAb EG2**

Die A431- und FaDu-Zellen wurden 2 h vor der Inkubation mit  $^{99m}\text{Tc}$ -EG2 vergleichsweise mit unmarkiertem EG2 oder C225 inkubiert, um Bindungsstellen zu blockieren. Dargestellt ist die Menge an gebundener Substanz pro Zelle in Abhängigkeit von der Art der Blockierung. Die Fehlerbalken entsprechen dabei den Standardabweichungen der Mittelwerte einer Vierfachbestimmung.

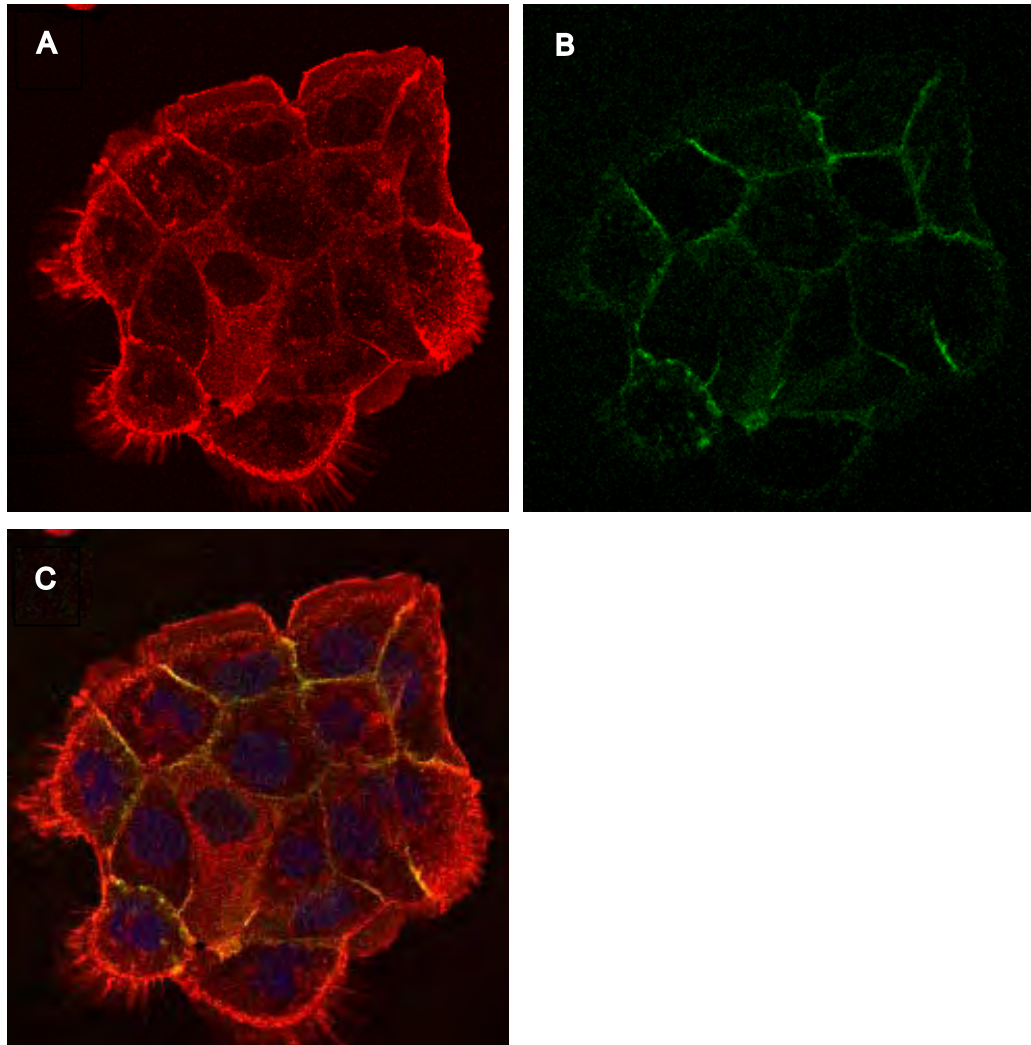
#### **4.5.2 Untersuchung der Bindungsfähigkeiten der Einzeldomänenantikörper und Nanopartikelkonjugate mittels Immunfluoreszenz**

Um erste Erkenntnisse über die Bindungsfähigkeiten und Lokalisation der sdAb-NP-Konjugate im Vergleich zu den sdAb zu erlangen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Hierfür wurden A431-Zellen entweder mit 100 nM 7C12 bzw. EG2 in Kombination mit einem Penta-His Alexa Fluor 488 Antikörper oder mit 100 µg des EG2-NP-Konjugats für bis zu 3 h bei 37 °C inkubiert und anschließend detektiert. Die Behandlung der A431-Zellen mit 7C12 zeigte bereits nach einer Inkubationszeit von 10 min eine homogene Verteilung des sdAb innerhalb der Zellen, wobei die sich überlagernden Fluoreszenzsignale des EGF-Rezeptors (rot) und des Einzeldomänenantikörpers 7C12 (grün) auf eine Co-Lokalisation hindeuten (Abbildung 22). Beide Proteine waren vorrangig an der Zellmembran zu finden. Nach 3 h Inkubation war keine Färbung des 7C12 mehr erkennbar (nicht gezeigt). Dies deutet auf einen Abbau des sdAb hin. Im Unterschied dazu zeigten behandelte A431-Zellen nach einer 10-minütigen Inkubation mit EG2 eine eindeutige Lokalisation des sdAb im Zellkern (Abbildung 23). Dies war auch nach 3 h Inkubation zu beobachten (nicht gezeigt). Eine Co-Lokalisation mit EGFR war nicht zu beobachten. Diesbezüglich sind in der Literatur keine Hinweise zu finden, sodass hier intensivere Studien erfolgen sollten.

Aus Zeitgründen erfolgte anschließend nur die Untersuchung der A431-Zellen, die mit dem hergestellten EG2-NP-Konjugat behandelt wurden. Da die eingesetzten micromer®-redF NP rot fluoreszieren, wurde der EGFR mit einem grün fluoreszierendem Sekundärantikörper detektiert. Die Behandlung der Zellen führte nach einer einstündigen Inkubation zur Aufnahme der Konjugate, sodass diese im Zytoplasma, in der Nähe des Zellkerns, lokalisiert waren (Abbildung 24). Dies könnte einen Hinweis darauf geben, dass die Konjugation des EG2 an Nanopartikel eine Aufnahme in den Zellkern erschwert, die Eigenschaft der Internalisierung bleibt allerdings erhalten. Gleichzeitig liefert es den Beweis dafür, dass die Konjugation der zielsuchenden Einheit und der PMMA-Nanopartikel funktioniert und bestätigt damit die Aussage der DLS-Messung. Nichtsdestotrotz müssen auch hier detaillierte Untersuchungen erfolgen, um repräsentative Ergebnisse zu erzielen. Weiterhin sollten Bindungsstudien

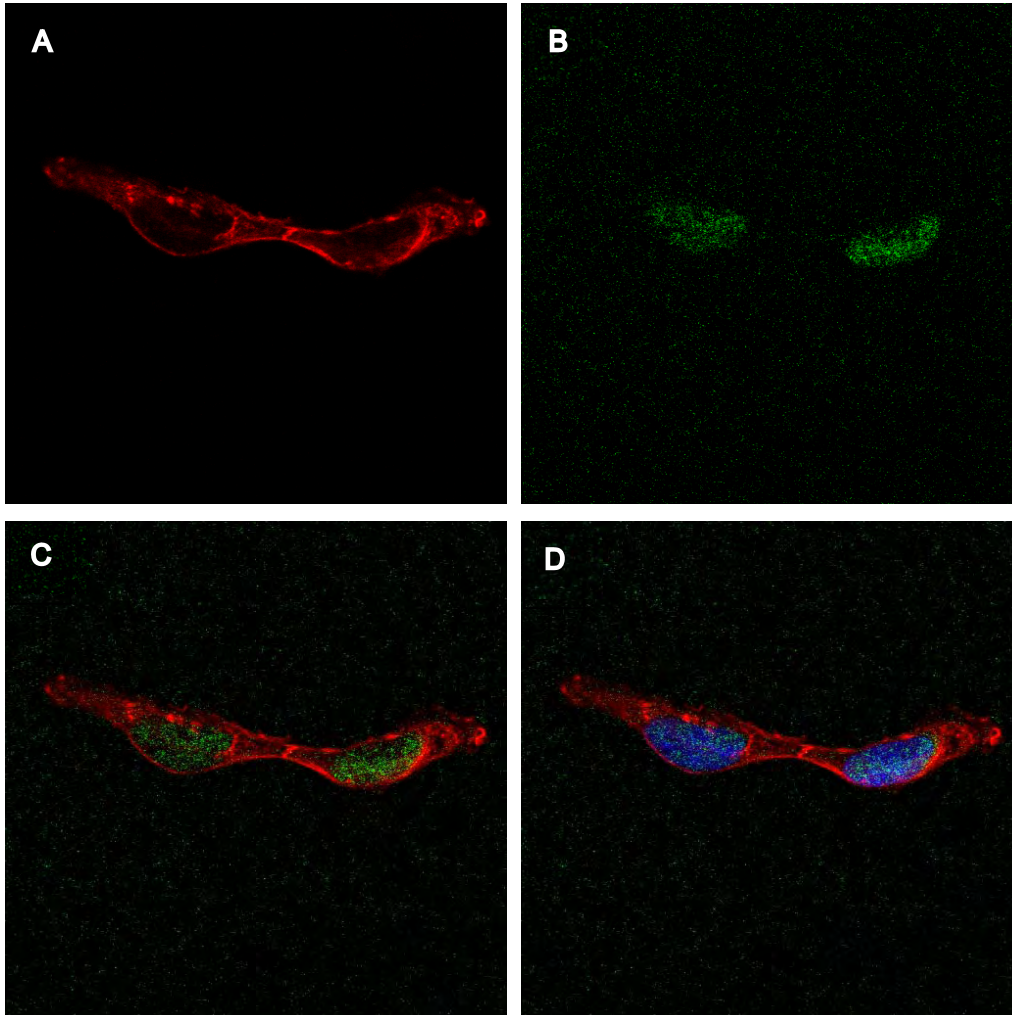


an FaDu-Zellen erfolgen, da diese ein anderes Expressionsprofil bezüglich des EGFR aufweisen und damit zusätzliche Erkenntnisse liefern.



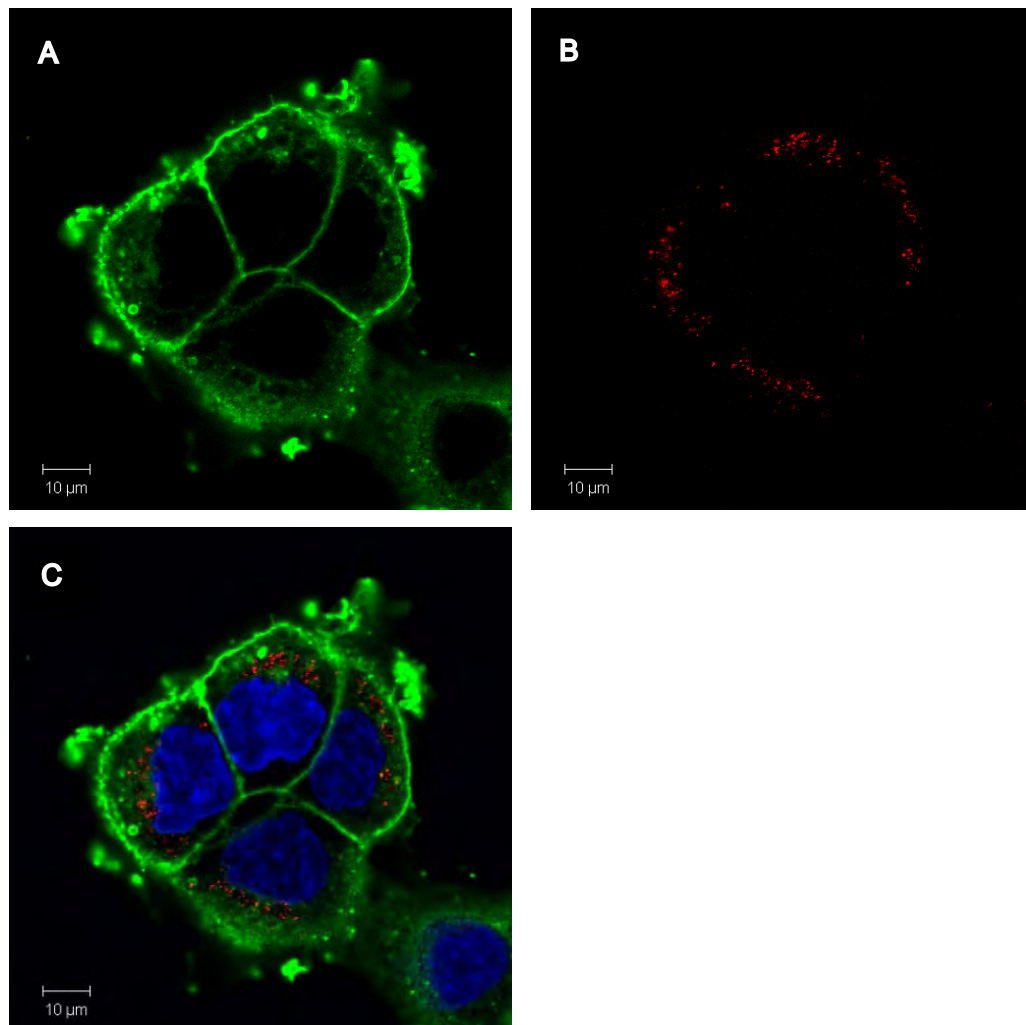
**Abbildung 22: Immunfluoreszenzfärbung 7C12-behandelter A431-Zellen**

A431-Zellen wurden 10 min bei 37 °C mit 100 nM 7C12 und anschließend mit einem Penta-His Alexa Fluor 488 Antikörper inkubiert. A) EGFR (rot). B) 7C12 (grün). C) Overlay aus A und B mit DAPI-Färbung des sich im Zellkern befindlichen Chromatins. Hierbei wird die Co-Lokalisation von EGFR und 7C12 anhand der sich überlagernden Fluoreszenzsignale (gelb) deutlich.



**Abbildung 23: Immunfluoreszenzfärbung EG2-behandelter A431-Zellen**

A431-Zellen wurden 10 min bei 37 °C mit 100 nM EG2 und anschließend mit einem Penta-His Alexa Fluor 488 Antikörper inkubiert. A) EGFR (rot). B) 7C12 (grün). C) Overlay aus A und B, wobei keine Co-Lokalisation von EGFR und EG2 zu beobachten ist. D) C mit DAPI-Färbung des sich im Zellkern befindlichen Chromatins. Hierbei zeigt sich, die Lokalisation des EG2 im Zellkern.



**Abbildung 24: Immunfluoreszenzfärbung EG2-NP-Konjugat behandelter A431-Zellen**

A431-Zellen wurden 1 h bei 37 °C mit 100 µg des EG2-Nanopartikelkonjugats inkubiert. A) EGFR (grün). B) fluoreszierende EG2- Nanopartikelkonjugate. C) Overlay aus A und B mit DAPI-Färbung des sich im Zellkern befindlichen Chromatins.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte die erfolgreiche Herstellung von zwei EGFR-spezifischen Einzeldomänenantikörpern in *E. coli* gezeigt werden. Beide sdAb wurden aus der zytoplasmatischen Fraktion der Bakterienzellen isoliert und mittels immobilisierter Metallchelate-Affinitätschromatographie gereinigt. Anschließend konnte die korrekte Ausbildung der intramolekularen Disulfidbrücken für beide Einzeldomänenantikörper gezeigt werden. Neben den Extinktionskoeffizienten wurde die Anzahl der zugänglichen Aminogruppen für beide native sdAb bestimmt und die radioaktive Markierung mit  $^{99m}\text{Tc}$  erfolgreich durchgeführt. *In-vitro*-Bindungsassays, unter Verwendung der humanen Krebszelllinien A431 und FaDu bestätigten die in der Literatur beschriebene Affinität beider Einzeldomänenantikörper zu EGFR. Auch die Konjugation der gereinigten Proteine an fluoreszente Nanopartikel konnte gezeigt werden, wobei die *In-vitro*-Untersuchungen zur Bindung der NP-sdAb-Konjugate an EGFR-präsentierende Tumorzellen mittels konfokaler Mikroskopie und Durchflusszytometrie bei der Fertigstellung der Arbeit noch nicht abgeschlossen waren.

## Literaturverzeichnis

- [1] Nennecke, A.; Brenner, H.; Eberle, A.; Geiss, K.; Holleczeck, B.; Kieschke, J.; Kraywinkel, K. Überlebenschancen von Krebspatienten in Deutschland. Auf dem Weg zu repräsentativen und vergleichbaren Aussagen. *Gesundheitswesen* **72** (2010) 692 - 699.
- [2] WHO Fact sheet N°297 Cancer. 03.04.2012.  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>
- [3] Herzog, H.; Rösch, F. PET- und SPECT-Technik. *Pharm. Unserer Zeit* **34** (2005) 468 - 473.
- [4] Cai, W. B.; Chen, K.; He, L. N.; Cao, Q. H.; Koong, A.; Chen, X. Y. Quantitative PET of EGFR expression in xenograft-bearing mice using Cu-64-labeled cetuximab, a chimeric anti-EGFR monoclonal antibody. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **34** (2007) 850 - 858.
- [5] Brown, J. M. Therapeutic targets in radiotherapy. *Int J Radiat Oncol* **49** (2001) 319 - 326.
- [6] Bonner, J. A.; Harari, P. M.; Giralt, J.; Azarnia, N.; Shin, D. M.; Cohen, R. B.; Jones, C. U.; Sur, R.; Raben, D.; Jassem, J.; Ove, R.; Kies, M. S.; Baselga, J.; Yousoufian, H.; Amellal, N.; Rowinsky, E. K.; Ang, K. K. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *New Engl J Med* **354** (2006) 567 - 578.
- [7] Humblet, Y. Cetuximab: an IgG(1) monoclonal antibody for the treatment of epidermal growth factor receptor-expressing tumours. *Expert Opin Pharmacol* **5** (2004) 1621 - 1633.
- [8] Holbro, T.; Civenni, G.; Hynes, N. E. The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Exp Cell Res* **284** (2003) 99 - 110.
- [9] Ciardiello, F.; Tortora, G. Drug therapy: EGFR antagonists in cancer treatment. *New Engl J Med* **358** (2008) 1160 - 1174.
- [10] McCubrey, J. A.; Steelman, L. S.; Abrams, S. L.; Lee, J. T.; Chang, F. M.; Bertrand, F. E.; Navolanic, P. M.; Terrian, D. M.; Franklin, R. A.; D'Assoro, A. B.; Salisbury, J. L.; Mazzarino, M. C.; Stivala, F.; Libra, M. Roles of the RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT pathways in malignant transformation and drug resistance in: *Advances in Enzyme Regulation, Vol 46, Proceedings*, Vol. 46 (Eds., Weber, G.; Weber, C. E. F.; Cocco, L.) (2006) 249 - 279.
- [11] Salomon, D. S.; Brandt, R.; Ciardiello, F.; Normanno, N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies *Crit Rev Oncol Hemat* **19** (1995) 183 - 232.
- [12] Matta, A.; Ralhan, R. Overview of current and future biologically based targeted therapies in head and neck squamous cell carcinoma. *Head & Neck Oncology* **1** (2009).

- [13] Lurje, G.; Lenz, H. J. EGFR Signaling and Drug Discovery. *Oncology* **77** (2009) 400 - 410.
- [14] Akimoto, T.; Hunter, N. R.; Buchmiller, L.; Mason, K.; Ang, K. K.; Milas, L. Inverse relationship between epidermal growth factor receptor expression and radiocurability of murine carcinomas. *Clin Cancer Res* **5** (1999) 2884 - 2890.
- [15] Mendelsohn, J.; Baselga, J. Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer. *J Clin Oncol* **21** (2003) 2787 - 2799.
- [16] Baumann, M.; Krause, M. Targeting the epidermal growth factor receptor in radiotherapy: radiobiological mechanisms, preclinical and clinical results. *Radiother Oncol* **72** (2004) 257 - 266.
- [17] Budach, V.; Stuschke, M.; Budach, W.; Baumann, M.; Geismar, D.; Grabenbauer, G.; Lammert, I.; Jahnke, K.; Stueben, G.; Herrmann, T.; Bamberg, M.; Wust, P.; Hinkelbein, W.; Wernecke, K. D. Hyperfractionated accelerated chemoradiation with concurrent fluorouracil-mitomycin is more effective than dose-escalated hyperfractionated accelerated radiation therapy alone in locally advanced head and neck cancer: Final results of the radiotherapy cooperative clinical trials group of the German cancer society 95-06 prospective randomized trial. *J Clin Oncol* **23** (2005) 1125 - 1135.
- [18] Burgess, A. W. EGFR family: Structure physiology signalling and therapeutic targets. *Growth Factors* **26** (2008) 263 - 274.
- [19] ElBakri, A.; Nelson, P. N.; Abu Odeh, R. O. The state of antibody therapy. *Hum Immunol* **71** (2010) 1243 - 1250.
- [20] Todd, P. A.; Brogden, R. N. Muromonab CD3 - a review of its pharmacology and therapeutic potential. *Drugs* **37** (1989) 871 - 899.
- [21] Holliger, P.; Hudson, P. J. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol* **23** (2005) 1126 - 1136.
- [22] Li, S. Q.; Schmitz, K. R.; Jeffrey, P. D.; Wiltzius, J. J. W.; Kussie, P.; Ferguson, K. M. Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer Cell* **7** (2005) 301 - 311.
- [23] Hildebrandt, B.; le Coutre, P.; Nicolaou, A. Cetuximab: appraisal of a novel drug against colorectal cancer. *Recent Res Cancer* **176** (2007) 135 - 143.
- [24] Revets, H.; De Baetselier, P.; Muyldermans, S. Nanobodies as novel agents for cancer therapy. *Expert Opin Biol Ther* **5** (2005) 111 - 124.
- [25] Van de Wiele, C.; Revets, H.; Mertens, N. Radioimmunoimaging - Advances and prospects. *Q J Nucl Med Mol Im* **48** (2004) 317 - 325.
- [26] Iqbal, U.; Trojahn, U.; Albaghdadi, H.; Zhang, J.; O'Connor-McCourt, M.; Stanimirovic, D.; Tomanek, B.; Sutherland, G.; Abulrob, A. Kinetic analysis of novel mono- and

- multivalent VHH-fragments and their application for molecular imaging of brain tumours. *Brit J Pharmacol* **160** (2010) 1016 - 1028.
- [27] Kenanova, V.; Wu, A. M. Tailoring antibodies for nucleotide delivery. *Expert Opin Drug Deliv* **3** (2006) 53 - 70.
- [28] Bazin, R.; Boucher, G.; Monier, G.; Chevrier, M. C.; Verrette, S.; Broly, H.; Lemieux, R. Use of hu-IgG-SCID mice to evaluate the in-vivo stability of human monoclonal IgG antibodies. *J Immunol Methods* **172** (1994) 209-217.
- [29] Ghetie, V.; Ward, E. S. Transcytosis and catabolism of antibody. *Immunol Res* **25** (2002) 97-113.
- [30] Jain, M.; Kamal, N.; Batra, S. K. Engineering antibodies for clinical applications. *Trends Biotechnol* **25** (2007) 307 - 316.
- [31] Omidfar, K.; Rasaei, M. J.; Modjtahedi, H.; Forouzandeh, M.; Taghikhani, M.; Golmakani, N. Production of a novel camel single-domain antibody specific for the type III mutant EGFR. *Tumor Biol* **25** (2004) 296 - 305.
- [32] Hamerscaterman, C.; Atarhouch, T.; Muyldermans, S.; Robinson, G.; Hamers, C.; Songa, E. B.; Bendahman, N.; Hamers, R. Naturally-occurring antibodies devoid of light-chains. *Nature* **363** (1993) 446-448.
- [33] Woolven, B. P.; Frenken, L. G. J.; van der Logt, P.; Nicholls, P. J. The structure of the llama heavy chain constant genes reveals a mechanism for heavy-chain antibody formation. *Immunogenetics* **50** (1999) 98 - 101.
- [34] Nguyen, V. K.; Hamers, R.; Wyns, L.; Muyldermans, S. Loss of splice consensus signal is responsible for the removal of the entire C(H)1 domain of the functional camel IGG2A heavy-chain antibodies. *Mol Immunol* **36** (1999) 515-524.
- [35] Greenberg, A. S.; Avila, D.; Hughes, M.; Hughes, A.; McKinney, E. C.; Flajnik, M. F. A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks *Nature* **374** (1995) 168 - 173.
- [36] Altintas, I.; Kok, R. J.; Schiffelers, R. M. Targeting epidermal growth factor receptor in tumors: From conventional monoclonal antibodies via heavy chain-only antibodies to nanobodies. *Eur J Pharm Sci* **45** (2012) 399-407.
- [37] Deffar, K.; Shi, H. L.; Li, L.; Wang, X. Z.; Zhu, X. J. Nanobodies - the new concept in antibody engineering. *Afr J Biotechnol* **8** (2009) 2645 - 2652.
- [38] Harmsen, M. M.; De Haard, H. J. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. *Appl Microbiol Biotechnol* **77** (2007) 13 - 22.
- [39] Muyldermans, S. Single domain camel antibodies: current status. *Rev Mol Biotechnol* **74** (2001) 277 - 302.

- [40] Rahbarizadeh, F.; Rasaee, M. J.; Forouzandeh, M.; Allameh, A. A. Over expression of anti-MUC1 single-domain antibody fragments in the yeast *Pichia pastoris*. *Mol Immunol* **43** (2006) 426-435.
- [41] Muyldermans, S.; Atarhouch, T.; Saldanha, J.; Barbosa, J.; Hamers, R. Sequence and structure of VH domain from naturally-occurring camel heavy-chain immunoglobulins lacking light-chains. *Protein Eng* **7** (1994) 1129 - 1135.
- [42] Roovers, R. C.; Vosjan, M. J. W. D.; van Dongen, G. A. M. S.; van Bergen en Henegouwen, P. M. P. A biparatopic anti-EGFR nanobody efficiently inhibits solid tumour growth. *Int J Cancer* **129** (2011) 2013 - 2024.
- [43] Gainkam, L. O. T.; Huang, L.; Caveliers, V.; Keyaerts, M.; Hemot, S.; Vaneycken, I.; Vanhove, C.; Revets, H.; Baetselier, P. D.; Lahoutte, T. Comparison of the Biodistribution and Tumor Targeting of Two <sup>99m</sup>Tc-labeled Anti-EGFR Nanobodies in Mice, Using Pinhole SPECT/Micro-CT. *J Nucl Med* **49** (2008).
- [44] Bell, A.; Wang, Z. J.; Arbabi-Ghahroudi, M.; Chang, T. T. A.; Durocher, Y.; Trojahn, U.; Baardsnes, J.; Jaramillo, M. L.; Li, S. H.; Baral, T. N.; O'Connor-McCourt, M.; MacKenzie, R.; Zhang, J. B. Differential tumor-targeting abilities of three single-domain antibody formats. *Cancer Lett* **289** (2010) 81 - 90.
- [45] Levy, R.; Weiss, R.; Chen, G.; Iverson, B. L.; Georgiou, G. Production of correctly folded Fab antibody fragment in the cytoplasm of *Escherichia coli* trxB<sup>-</sup> mutants via the coexpression of molecular chaperones. *Protein Expr Purif* **23** (2001) 338 - 347.
- [46] Giard, D. J.; Aaronson, S. A.; Todaro, G. J.; Arnstein, P.; Kersey, J. H.; Dosik, H.; Parks, W. P. In-vitro cultivation of human tumors - establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer I* **51** (1973) 1417-1423.
- [47] Rangan, S. R. S. New Human Cell Line (FADU) from a Hypopharyngeal Carcinoma. *Cancer* **29** (1972) 117 - 121.
- [48] Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227** (1970) 680 - 685.
- [49] Sorensen, S. P. L. Supplement on the work on enzyme studies II On the measurement and significance of hydrogen ion concentration in enzymatic processes. *Biochem Z* **22** (1909) 352 - 356.
- [50] Sorensen, S. P. L. Enzyme studies - Note II - The measurement and the significance of hydrogenic concentrate in enzymatic processes. *Biochem Z* **21** (1909) 131 - 304.
- [51] Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193** (1951) 265 - 275.
- [52] Guglielmi, L.; Pierre, M. Expression of single-chain Fv fragments in *E. coli* cytoplasm. *Methods Mol Biol* **562** (2011) 215 - 244



- [53] Habeeb, A. F. S. Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzenesulfonic acid *Anal Biochem* **14** (1966) 328 - 336.
- [54] Stothard, P. The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques* **28** (2000) 1102 - 1104.
- [55] Hermanson, G. T., Academic Press (2008).
- [56] Nidhin, M.; Indumathy, R.; Sreeram, K. J.; Nair, B. U. Synthesis of iron oxide nanoparticles of narrow size distribution on polysaccharide templates. *Bull Mater Sci* **31** (2008) 93 - 96.
- [57] Malvern Zetasizer Nano ZS.  
[http://www.malvern.de/labger/products/zetasizer/zetasizer\\_nano/zetasizer\\_nano\\_zs.htm](http://www.malvern.de/labger/products/zetasizer/zetasizer_nano/zetasizer_nano_zs.htm)
- [58] Becker, N.; von Karasa, L. Sekundäre Prävention in: Kompendium Internistische Onkologie Schmoll, H.-J.; Höffken, K. und Possinger, K., Springer Verlag (2006) 307 - 339.
- [59] Huang, L.; Gai kam, L. O. T.; Caveliers, V.; Vanhove, C.; Keyaerts, M.; De Baetselier, P.; Bossuyt, A.; Revets, H.; Lahoutte, T. SPECT imaging with (99m)Tc-labeled EGFR-specific nanobody for in vivo monitoring of EGFR expression. *Mol Imaging Biol* **10** (2008) 167 - 175.
- [60] Karlsruhe, K. Gewebeentnahme aus der Brust. <http://www.klinikum-karlsruhe.com/institute/zentralinstitut-fuer-bildgebende-diagnostik/leistungsschwerpunkte/behandlungsmoeglichkeiten/gewebeentnahme-aus-der-brust.html>
- [61] Gai kam, L. O. T.; Keyaerts, M.; Caveliers, V.; Devoogdt, N.; Vanhove, C.; Van Grunsv en, L.; Muyldermans, S.; Lahoutte, T. Correlation Between Epidermal Growth Factor Receptor-Specific Nanobody Uptake and Tumor Burden: A Tool for Noninvasive Monitoring of Tumor Response to Therapy. *Mol Imaging Biol* **13** (2011) 940 - 948.
- [62] Ghahroudi, M. A.; Desmyter, A.; Wyns, L.; Hamers, R.; Muyldermans, S. Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. *FEBS Lett* **414** (1997) 521 - 526.
- [63] de Marco, A. Strategies for successful recombinant expression of disulfide bond-dependent proteins in Escherichia coli. *Microb Cell Fact* **8** (2009) 26.
- [64] Rahbarizadeh, F.; Rasae e, M. J.; Forouzandeh-Moghadam, M.; Allameh, A. A. High expression and purification of the recombinant camelid anti-MUC1 single domain antibodies in Escherichia coli. *Protein Express Purif* **44** (2005) 32 - 38.

- [65] Li, X.; Robbins, J. W.; Taylor, K. B. Effect of the levels of dissolved oxygen on the expression of recombinant proteins in four recombinant *Escherichia coli* strains. *J Ind Microbiol* **9** (1992) 1 - 10.
- [66] Thomassen, Y. E.; Meijer, W.; Sierkstra, L.; Verrips, C. T. Large-scale production of V-HH antibody fragments by *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb Technol* **30** (2002) 273 - 278.
- [67] Rahbarizadeh, F.; Ahmadvand, D.; Zahra, S. Nanobody; an old concept and new vehicle for immunotargeting. *Immunol Invest* **40** (2011) 299 - 338.
- [68] Frenken, L. G. J.; van der Linden, R. H. J.; Hermans, P.; Bos, J. W.; Ruuls, R. C.; de Geus, B.; Verrips, C. T. Isolation of antigen specific Llama V-HH antibody fragments and their high level secretion by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biotechnol* **78** (2000) 11 - 21.
- [69] Harmsen, M. M.; Van Solt, C. B.; Fijten, H. P. D.; Van Setten, M. C. Prolonged in vivo residence times of llama single-domain antibody fragments in pigs by binding to porcine immunoglobulins. *Vaccine* **23** (2005a) 4926 - 4934.
- [70] van der Vaart, J. M.; Pant, N.; Wolvers, D.; Bezemer, S.; Hermans, P. W.; Bellamy, K.; Sarker, S. A.; van der Logt, C. P. E.; Svensson, L.; Verrips, C. T.; Hammarstrom, L.; van Klinken, B. J. W. Reduction in morbidity of rotavirus induced diarrhoea in mice by yeast produced monovalent llama-derived antibody fragments. *Vaccine* **24** (2006) 4130 - 4137.
- [71] Sethuraman, N.; Stadheim, T. A. Challenges in therapeutic glycoprotein production. *Curr Opin Biotech* **17** (2006) 341 - 346.
- [72] Behr, T. M.; Goldenberg, D. M.; Becker, W. Reducing the renal uptake of radiolabeled antibody fragments and peptides for diagnosis and therapy: present status, future prospects and limitations. *Eur J Nucl Med* **25** (1998) 201 - 212.
- [73] Miao, Y. B.; Owen, N. K.; Whitener, D.; Gallazzi, F.; Hoffman, T. J.; Quinn, T. P. In vivo evaluation of (188)re-labeled alpha-melanocyte stimulating hormone peptide analogs for melanoma therapy. *Int J Cancer* **101** (2002) 480 - 487.
- [74] Adams, G. P.; Shaller, C. C.; Dadachova, E.; Simmons, H. H.; Horak, E. M.; Tesfaye, A.; Klein-Szanto, A. J. P.; Marks, J. D.; Brechbiel, M. W.; Weiner, L. M. A single treatment of yttrium-90-labeled CHX-A "-C6.5 diabody inhibits the growth of established human tumor xenografts in immunodeficient mice. *Cancer Res* **64** (2004) 6200 - 6206.
- [75] Barone, R.; Pauwels, S.; De Camps, J.; Krenning, E. P.; Kvols, L. K.; Smith, M. C.; Bouterfa, H.; Devuyt, O.; Jamar, F. Metabolic effects of amino acid solutions infused for renal protection during therapy with radiolabelled somatostatin analogues. *Nephrol Dial Transplant* **19** (2004) 2275 - 2281.

- [76] Wu, A. M.; Senter, P. D. Arming antibodies: prospects and challenges for immunoconjugates. *Nat Biotechnol* **23** (2005) 1137 - 1146.
- [77] Wedemeyer, W. J.; Welker, E.; Narayan, M.; Scheraga, H. A. Disulfide bonds and protein folding. *Biochemistry* **39** (2000) 4207 - 4216.
- [78] Waibel, R.; Alberto, R.; Willuda, J.; Finnern, R.; Schibli, R.; Stichelberger, A.; Egli, A.; Abram, U.; Mach, J. P.; Plückthun, A.; Schubiger, P. A. Stable one-step technetium-99m labeling of His-tagged recombinant proteins with a novel Tc(I)-carbonyl complex. *Nat Biotechnol* **17** (1999) 897 - 901.
- [79] Dumoulin, M.; Conrath, K.; Van Meirhaeghe, A.; Meersman, F.; Heremans, K.; Frenken, L. G. J.; Muyldermans, S.; Wyns, L.; Matagne, A. Single-domain antibody fragments with high conformational stability. *Protein Sci* **11** (2002) 500 - 515.
- [80] Ewert, S.; Cambillau, C.; Conrath, K.; Plückthun, A. Biophysical Properties of Camelid V<sub>HH</sub> Domains Compared of Human V<sub>H3</sub> Domains. *Biochemistry-US* **41** (2002).
- [81] Perez, J. M. J.; Renisio, J. G.; Prompers, J. J.; van Platerink, C. J.; Cambillau, C.; Darbon, H.; Frenken, L. G. J. Thermal unfolding of a llama antibody fragment: A two-state reversible process. *Biochemistry* **40** (2001) 74 - 83.
- [82] Yang, J.; Lee, C. H.; Park, J.; Seo, S.; Lim, E. K.; Song, Y. J.; Suh, J. S.; Yoon, H. G.; Huh, Y. M.; Haam, S. Antibody conjugated magnetic PLGA nanoparticles for diagnosis and treatment of breast cancer. *J Mater Chem* **17** (2007) 2695 - 2699.
- [83] Sukhanova, A.; Even-Desrumeaux, K.; Kisserli, A.; Tabary, T.; Reveil, B.; Millot, J. M.; Chames, P.; Baty, D.; Artemyev, M.; Oleinikov, V.; Pluot, M.; Cohen, J. H. M.; Nabiev, I. Oriented conjugates of single-domain antibodies and quantum dots: toward a new generation of ultrasmall diagnostic nanoprobe. *Nanomed-Nanotechnol* **8** (2012) 516 - 525.
- [84] Pitek, A. S.; O'Connell, D.; Mahon, E.; Monopoli, M. P.; Bombelli, F. B.; Dawson, K. A. Transferrin Coated Nanoparticles: Study of the Bionano Interface in Human Plasma. *Plos One* **7** (2012).
- [85] Gamou, S.; Kim, Y. S.; Shimizu, N. Different responses to EGF in two human carcinoma cell lines, A431 and UCVA-1, possessing high numbers of EGF receptors. *Mol Cell Endocrinol* **37** (1984) 205 - 213.
- [86] Fabricant, R. N.; Delarco, J. E.; Todaro, G. J. Nerve growth-factor receptors on human melanoma cells in culture *Proc Natl Acad Sci USA* **74** (1977) 565 - 569.
- [87] Solorzano, C. C.; Jones, S. C.; Pettitjean, M.; Odaniel, T. G.; Auffenberg, T.; Woost, P. G.; Copeland, E. M.; Moldawer, L. I.; Schultz, G. S.; MacKay, S. L. D. Inhibition of transforming growth factor alpha Stimulation of human squamous cell carcinoma of the head and neck with anti-TGF-alpha antibodies and tyrphostin. *Ann Surg Oncol* **4** (1997) 670 - 684.

- [88] Rusckowski, M.; Qu, T.; Chang, F.; Hnatowich, D. J. Technetium-99m labeled epidermal growth factor-tumor imaging in mice. *J Pept Res* **50** (1997) 393 - 401.
- [89] Reilly, R. M.; Kiarash, R.; Cameron, R. G.; Porlier, N.; Sandhu, J.; Hill, R. P.; Vallis, K.; Hendler, A.; Gariepy, J. In-111-labeled EGF is selectively radiotoxic to human breast cancer cells overexpressing EGFR. *J Nucl Med* **41** (2000) 429 - 438.
- [90] Barrett, T.; Koyama, Y.; Hama, Y.; Ravizzini, G.; Shin, I. S.; Jang, B. S.; Paik, C. H.; Urano, Y.; Choyke, P. L.; Kobayashi, H. In vivo diagnosis of epidermal growth factor receptor expression using molecular imaging with a cocktail of optically labeled monoclonal antibodies. *Clin Cancer Res* **13** (2007) 6639 - 6648.

---

## **Selbständigkeitserklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorgelegte Master Thesis selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen und Zitate kenntlich gemachten Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Diese Thesis hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen.

Hamburg, 07.12.2012

Stefanie Witecy