

Eliminierung FVIII-spezifischer B-Zellen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich 15

der Johann Wolfgang Goethe-Universität

in Frankfurt am Main

von

Kerstin Brettschneider

aus Karlsruhe

Frankfurt 2018

(D 30)

vom Fachbereich 15 der

Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Sven Klimpel

Gutachter : Prof. Dr. Dirk Schwabe

Prof. Dr. Anna-Starzinski-Powitz

Datum der Disputation : 18. September 2018

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	9
1.1	Hämostase.....	9
1.1.1	Gerinnungsfaktor VIII	11
1.2	Hämophilie A.....	13
1.2.1	Therapie	14
1.2.2	Die Entwicklung einer FVIII-spezifischen Immunantwort	15
1.2.2.1	Der B-Zellrezeptor	19
1.2.3	Erworbene Hämophilie A.....	20
1.2.4	Klassifizierung von FVIII-Inhibitoren.....	20
1.2.5	Risikofaktoren für die Entwicklung von FVIII-Inhibitoren	23
1.2.6	Therapie von Inhibitor-Patienten	25
1.2.6.1	Immuntoleranz-Therapie (ITI).....	25
1.2.6.2	Weitere Therapie-Möglichkeiten	27
1.2.6.3	Präklinische Ansätze	28
1.3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Exotoxin A.....	30
1.3.1	Therapeutische Immuntoxine basierend auf Exotoxin A.....	31
1.4	Zielsetzung.....	32
2	Methoden.....	34
2.1	Molekularbiologische Methoden	34
2.1.1	DNA-Präparation	34
2.1.2	DNA-Restriktion.....	34
2.1.3	Agarose-Gelelektrophorese	34

2.1.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	34
2.1.4.1	Klonierung der FVIII-Domänen	36
2.1.4.2	<i>Site-Directed Mutagenesis</i>	36
2.1.5	Ligation	36
2.1.6	Sequenzierung	36
2.1.7	Messung der DNA-Konzentration	36
2.1.8	Arbeiten mit <i>E. coli</i>	37
2.1.8.1	Kultivierung von <i>E. coli</i>	37
2.1.8.2	Lagerung	37
2.1.8.3	Herstellung chemisch-kompetenter <i>E. coli</i>	37
2.1.8.4	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	37
2.1.8.5	Transformation elektrokompeter <i>E. coli</i>	38
2.1.8.6	Bakterielle Proteinproduktion	38
2.2	Zellbiologische Methoden	38
2.2.1	Zellzählung	38
2.2.2	Kultivierung eukaryotischer Zelllinien	39
2.2.2.1	HEK293T	39
2.2.2.2	BO2C11- und LE2E9-Hybridomas	39
2.2.2.3	Raji	39
2.2.3	Transiente Transfektion von HEK293T	39
2.2.4	MTT-Test zur Bestimmung der Lebendzellzahl	40
2.2.5	Durchflusszytometrische Analyse von BO2C11-Hybridomas	40
2.2.6	Präparation muriner Splenozyten	41
2.2.7	Restimulation FVIII-spezifischer B-Zellen	41

2.2.8	Bestimmung Zytotoxizität <i>ex vivo</i>	41
2.3	Proteinchemische Arbeitsmethoden	42
2.3.1	Lagerung von Proteinen	42
2.3.2	Präparation rekombinant exprimierter Proteine.....	42
2.3.2.1	<i>E. coli</i>	42
2.3.2.2	HEK293T	42
2.3.3	Aufreinigung rekombinanter Proteine mittels <i>Immobilized Metal Ion Chromatography</i> (IMAC).....	42
2.3.4	Dialyse und Konzentration proteinhaltiger Lösungen.....	43
2.3.5	Messung der Proteinkonzentration.....	44
2.3.6	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ...	44
2.3.7	Coomassie-Färbung	45
2.3.8	Westernblot	45
2.3.9	Biotinylierung von HSA-hC2.....	45
2.3.10	Präparation der schweren und der leichten Kette von FVIII durch Kationenaustauschchromatographie	46
2.3.11	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA)	46
2.3.11.1	Bindung der rekombinant produzierten Proteine an Antikörper	46
2.3.11.2	Domänenspezifität von IgG	47
2.3.11.3	Stabilität <i>in vitro</i>	48
2.3.12	LPS-Entfernung aus proteinhaltigen Lösungen.....	48
2.3.13	Bestimmung des LPS-Gehalts	49
2.3.14	<i>Enzyme-Linked Immuno Spot Assay</i> (ELISPOT).....	49
2.4	Tierexperimentelle Methoden	50

2.4.1	Blutentnahme und Plasmapräparation	50
2.4.2	Anästhesie.....	51
2.4.3	FVIII-Immunisierung und Milzentnahme.....	51
2.4.4	Injektion der Immuntoxine und Kontrollen	51
2.5	Grafische und Statistische Auswertung	51
3	Ergebnisse.....	53
3.1	Produktion und Charakterisierung der Immuntoxine und Kontrollen	53
3.1.1	Immuntoxin hC2-ETA.....	53
3.1.2	Immuntoxin hA2-ETA	58
3.1.3	Kontrolle ETA	60
3.1.4	Kontrolle HSA-hC2	62
3.1.5	Zusammenfassung	64
3.2	Untersuchung der Eliminierungseffizienz von hC2-ETA	65
3.2.1	Eliminierung der hC2-spezifischen Hybridoma-Zelllinie BO2C11	65
3.2.2	Eliminierung hC2-spezifischer B-Zellen <i>ex vivo</i>	68
3.2.3	Eliminierung hC2-spezifischer B-Zellen <i>in vivo</i>	73
4	Diskussion	83
4.1	Produktion und Charakterisierung der Immuntoxine und Kontrollen	83
4.2	Untersuchung der Eliminierungseffizienz von hC2-ETA	87
4.2.1	Eliminierung der hC2-spezifischen Hybridoma-Zelllinie BO2C11	87
4.2.2	Eliminierung hC2-spezifischer B-Zellen <i>ex vivo</i>	89
4.2.3	Eliminierung hC2-spezifischer B-Zellen <i>in vivo</i>	92
4.3	Fazit	97
5	Material	99

5.1	Hersteller.....	99
5.2	Bakterienstämme	101
5.3	Zelllinien	102
5.4	Versuchstiere	103
5.5	Nährmedien	103
5.6	Puffer und Lösungen.....	105
5.6.1	Puffer und Lösungen für die Molekularbiologie	105
5.6.2	Puffer und Lösungen für zellbiologische Methoden	106
5.6.3	Puffer und Lösungen für die proteinchemische Methoden.....	107
5.6.4	Puffer und Lösungen für tierexperimentelle Methoden	110
5.7	Plasmide	110
5.8	Oligonukleotide	111
5.9	Proteine und Enzyme.....	113
5.10	Antikörper.....	113
5.11	Kits	114
5.12	Chemikalien	115
5.13	Geräte und Software.....	117
5.14	Plastikwaren und andere Materialien.....	119
6	Anhang	122
7	Quellen	125
8	Abkürzungsverzeichnis.....	138
9	Tabellenverzeichnis.....	142
10	Abbildungsverzeichnis.....	142
11	Danksagung	Fehler! Textmarke nicht definiert.

12	Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.
12.1	Persönliche Daten.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
12.2	Akademischer Werdegang.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
12.3	Preise und Auszeichnungen	Fehler! Textmarke nicht definiert.
12.4	Publikationen	Fehler! Textmarke nicht definiert.
12.5	Abstracts	Fehler! Textmarke nicht definiert.
12.6	Sprachkenntnisse	Fehler! Textmarke nicht definiert.

1 Einleitung

1.1 Hämostase

Eine intakte Hämostase ist ein lebenswichtiger Mechanismus, der nach Gewebsverletzungen vor größeren Blutverlusten schützt und anschließend die Wundheilung sicherstellt. Die Hämostase lässt sich in primäre und sekundäre Hämostase aufteilen, wobei die primäre Hämostase zunächst durch Adhäsion und Aggregation der roten Blutplättchen (Thrombozyten) zur Bildung eines primären Thrombus führt. Die sekundäre Hämostase sorgt anschließend für die Formation eines stabilen Blutgerinnsels mithilfe plasmatischer Gerinnungsfaktoren.

Die Initialisierung der sekundären Hämostase erfolgt durch Kontakt zwischen zirkulierendem FVII und extravaskulären Zellen, die Gewebefaktor (*Tissue Factor*; TF) auf ihrer Oberfläche exprimieren. Dadurch kommt es zur Aktivierung von FVII (FVIIa), welcher wiederum kleine Mengen FX aktiviert. Aktivierter FX (FXa) assoziiert daraufhin mit aktiviertem FV (FVa), ebenfalls auf der Oberfläche der TF-exprimierenden Zelle, und bildet den sogenannten Prothrombinase-Komplex, der zunächst kleine Mengen Thrombin generiert¹. Sobald FXa sich aus dem Komplex löst und von der Zelloberfläche dissoziiert, wird dieser schnell durch *Tissue Factor Pathway Inhibitor* und Antithrombin III inhibiert. Dies sorgt für eine eindeutige Lokalisierung der Gerinnung und verhindert damit auch die Aktivierung der Gerinnung an weiteren Stellen (Abbildung 1A).

Das während der Initiierungsphase generierte Thrombin sorgt in der anschließenden Ausbreitungsphase für die Aktivierung der aggregierten Thrombozyten, die anschließend Rezeptoren und Bindungsstellen für die Gerinnungskaskade auf der Oberfläche präsentieren. Weiterhin ist das gebildete Thrombin dazu in der Lage, im Rahmen einer Rückkopplungsschleife die Gerinnungsfaktoren FV, FIX und FVIII zu aktivieren.

Die anschließende Übertragungsphase findet auf der Oberfläche der aktivierten Thrombozyten statt. Durch Bindung von FVIIIa und FIXa bildet sich der sogenannte Tenase-Komplex, welcher erneut und außerdem in großen Mengen FX aktiviert. Auf der Oberfläche des aktivierten Thrombozyten assoziiert der neu gebildete FXa dann

mit neu gebildeten FVa wiederum zum Prothrombinase-Komplex (Abbildung 1B). Durch die Bildung des Tenase-Komplexes kommt es mithilfe positiver Rückkopplung zur Generierung großer Mengen an Thrombin durch den Prothrombinase-Komplex, was wiederum zur schnellen Bildung eines Fibringerinnsels beiträgt^{2,3}.

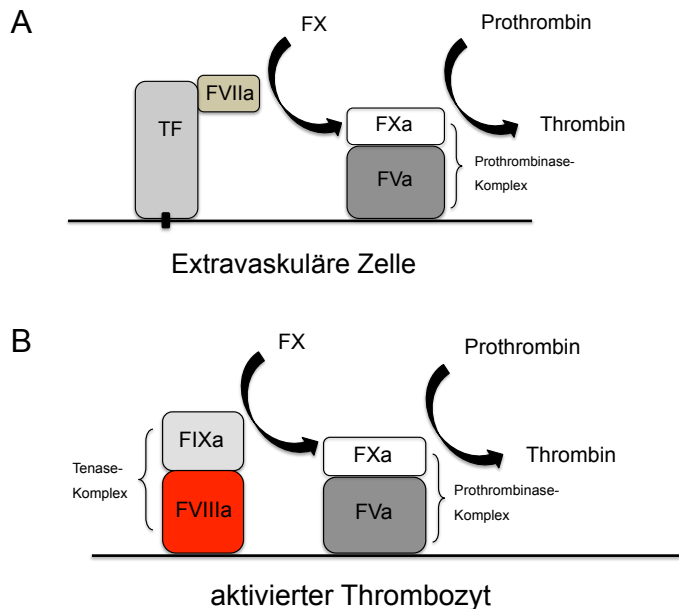


Abbildung 1: Schematische Darstellung der sekundären Hämostase. (A) Die Assemblierung von TF und FVIIa auf der Oberfläche von extravaskulären Zellen führt zur Aktivierung von FX. FXa assoziiert mit FVa zum Prothrombinase-Komplex und führt so zur Generierung von geringen Mengen Thrombin. (B) Das in (A) generierte Thrombin führt wiederum zur Aktivierung von Thrombozyten und zur Aktivierung der Gerinnungsfaktoren V, IX und VIII. FIXa und FVIIIa bilden auf der Oberfläche der Thrombozyten den Tenase-Komplex, welcher große Mengen FX aktiviert. FXa assoziiert mit FVa zum Prothrombinase-Komplex, der wiederum große Mengen Thrombin generiert.

Das gebildete Thrombin spaltet aus inaktivem Fibrinogen Monomere ab, die sich zusammenlagern und mithilfe von FXIIIa kovalent quervernetzt werden. Diese Quervernetzung trägt zur Stabilisierung des Gerinnsels bei. Ein Abbruch der Thrombingenerierung wird durch Inaktivierung von FVa durch Protein S und aktiviertes Protein C sichergestellt, wobei Thrombin wiederum durch Antithrombin III inhibiert wird⁴. Im Anschluss an die sekundäre Hämostase beginnt mit der Einwanderung von Fibroblasten schließlich die Wundheilung.

Die Hämostase ist ein empfindliches System, das ein Gleichgewicht zwischen vielen verschiedenen Komponenten umfasst. Fehlt eine Komponente oder ist sie im Überschuss vorhanden, so kann dies schwerwiegende Konsequenzen haben.

1.1.1 Gerinnungsfaktor VIII

Das X-chromosomal gelegene FVIII-Gen umfasst 180 kb mit insgesamt 26 Exons. Die Produktion des 2351 Aminosäuren (AS) langen Polypeptids inklusive Signalpeptid und mit der Domänenstruktur A1-a1-A2-a2-B-a3-A3-C1-C2 findet vornehmlich in Hepatozyten und Endothelzellen statt⁵. Neben den großen Hauptstruktur-Domänen (A1, A2, B, A3, C1, C2) befinden sich Regionen, die reich an sauren Resten sind und außerdem sulfatierte Tyrosinreste besitzen (a1, a2, a3). Im Anschluss an die Synthese gelangt das Polypeptid in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums. Hier wird das Signalpeptid abgespalten und FVIII glykosyliert, wobei über 75 % der Glykosylierungen an der B-Domäne stattfinden^{5,6}. Nach Transport und weiteren posttranslationalen Modifikationen im Golgi-Apparat wird das Glykoprotein schließlich sekretiert.

FVIII wird extrazellulär gespalten und zirkuliert als Heterodimer, bestehend aus einer schweren und einer leichten Kette. Hierbei besteht die schwere Kette aus zwei A-Domänen und der B-Domäne (A1-A2-B, 90-200 kDa) und die leichte Kette aus einer A-Domäne und zwei C-Domänen (A3-C1-C2, 80 kDa). FVIII besitzt eine gewisse Heterogenität innerhalb der schweren Kette, welche durch unterschiedliche Längen der B-Domäne zustande kommt^{7,8}. Die beiden Ketten sind innerhalb der A1- und der A3-Domäne Metallionen-abhängig assoziiert⁹. Die A-Domänen sowie die C-Domänen zeichnen sich jeweils durch ca. 40 % Sequenzidentität untereinander aus, wohingegen die B-Domäne weder Homologien zu anderen Proteinen aufweist noch für die Gerinnungsfunktion von Bedeutung ist¹⁰. Die Funktion der B-Domäne ist zwar nicht eindeutig geklärt, dennoch scheint sie unter anderem bei der Sekretion sowie der Aktivierung und Inaktivierung von FVIII eine Rolle zu spielen⁸. Nicht aktivierter zirkulierender FVIII befindet sich in Komplex mit dem Trägerprotein vWF, welcher den Gerinnungsfaktor vor vorzeitiger Aktivierung und enzymatischem Abbau schützt. Durch die Assoziation von vWF und FVIII wird sowohl die Bindung an die Phospholipidmembran der aktivierten Thrombozyten als auch an FIXa verhindert¹¹⁻¹³. Wichtige Bindungsstellen für vWF befinden sich vor allem in der C2- und der C1-Domäne und in der sauren a3-Region¹⁴⁻¹⁷.

FVIII wird durch Thrombin-abhängige proteolytische Spaltung aktiviert (Abbildung 2). Die Spaltung an der Stelle Arg372 (a1-A1) sorgt für die Exposition einiger FIXa-

Bindestellen, wobei sich die Mehrheit der Bindestellen innerhalb der leichten Kette (A3-C1-C2) befindet¹⁸. Die Spaltung an der Stelle Arg740 (a2-B) führt zur Abspaltung der B-Domäne.

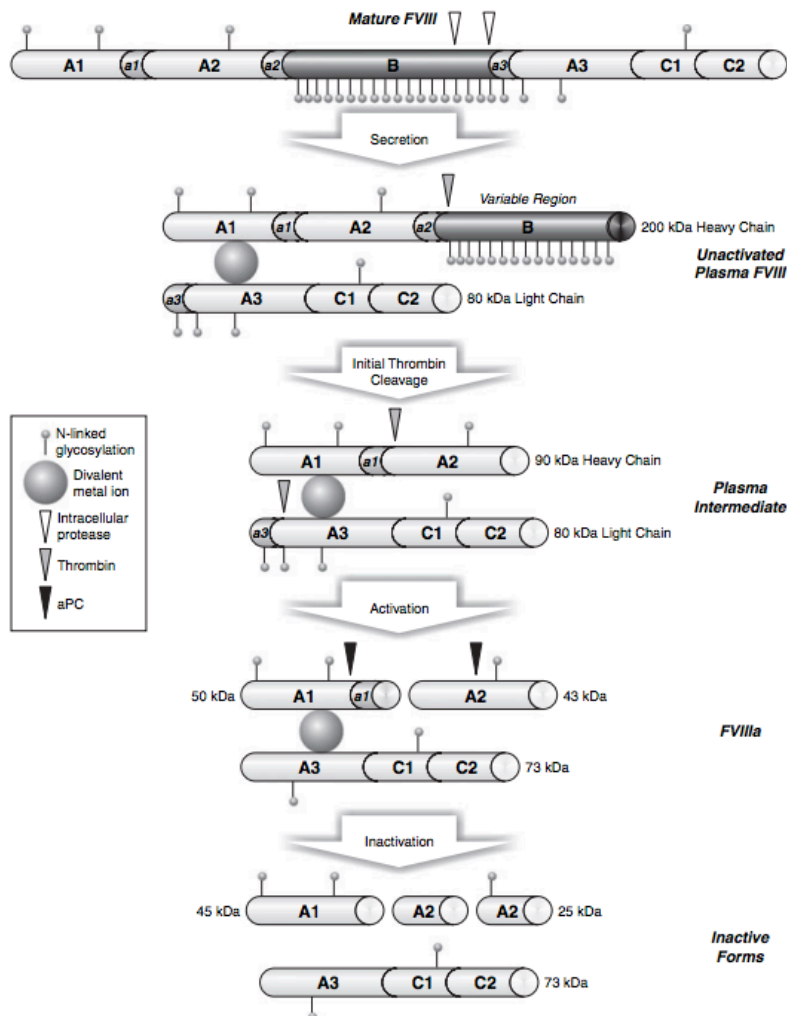


Abbildung 2: Domänenstruktur und Prozessierung von FVIII. Schaubild aus Pipe *et al.*¹. FVIII zirkuliert als Heterodimer, bestehend aus einer leichten (*light chain*) und einer schweren Kette (*heavy chain*), die durch Metallionen-abhängige und -unabhängige Wechselwirkungen assoziiert sind. Durch Thrombinspaltung wird FVIII aktiviert (FVIIIa) und dissoziiert von vWF und ist so in der Lage, mit FIXa und der Phospholipidmembran zu interagieren um den Tenase-Komplex zu bilden. Durch Dissoziation der A2-Domäne und proteolytischer Spaltung mithilfe von aktiviertem Protein C (aPC) wird FVIIIa inaktiviert.

Die Spaltung der leichten Kette an der Stelle Arg1689 (a3-A3) erlaubt die Dissoziation von FVIII von vWF und somit die Bildung des Tenase-Komplexes durch Assoziation des neu formierten Heterotrimeres (FVIIIa) mit FIXa auf der Phospholipidmembran¹⁹⁻²³. Der Kontakt zwischen FVIIIa und FIXa erstreckt sich über Oberflächen innerhalb der A2- und der A3-Domäne²⁴. In Abbildung 3 sind sowohl die Domänenorganisation als auch die Interaktionen von FVIII innerhalb des Tenase-Komplexes dargestellt.

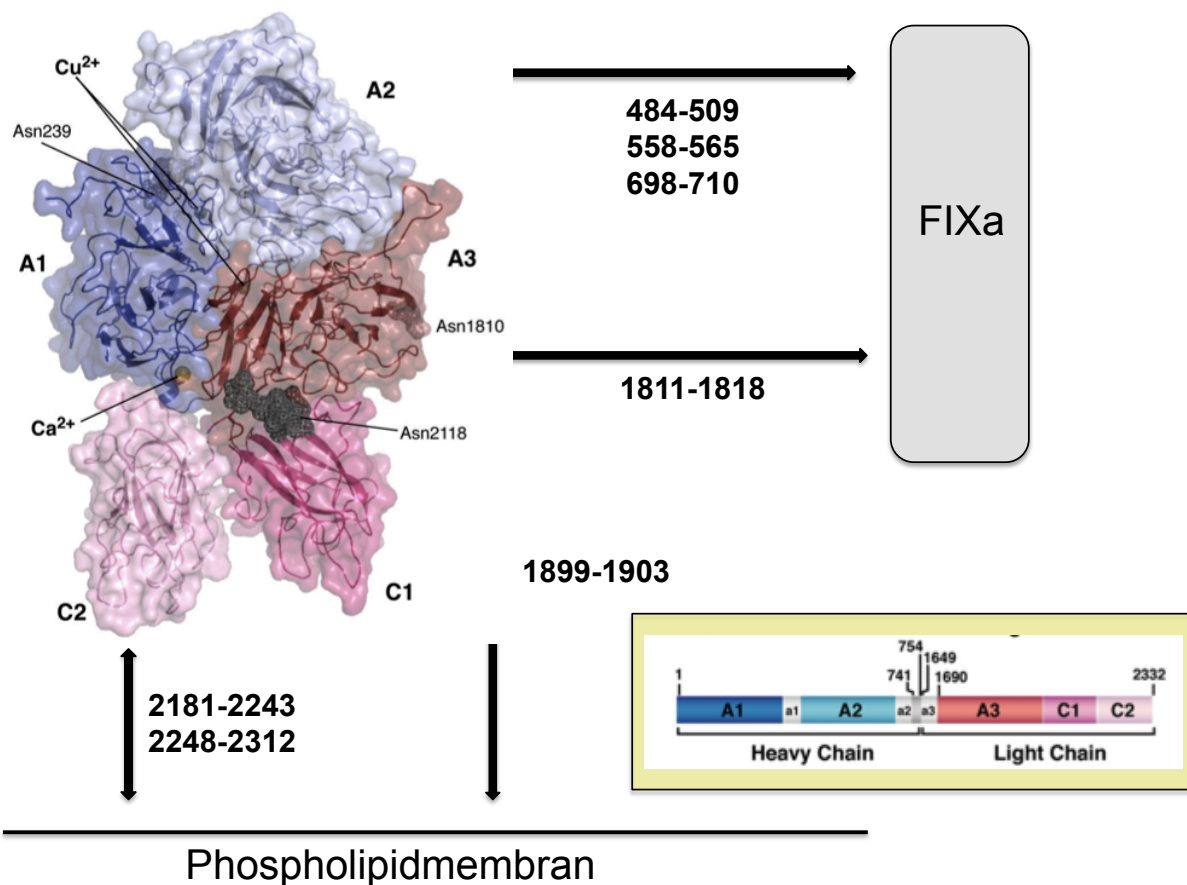


Abbildung 3: Interaktionen von FVIII im Tenase-Komplex. Dargestellt ist die Domänenorganisation (gelbe Box) und die Kristallstruktur eines B-Domänen-freien FVIII-Moleküls aus Ngo *et al.*²⁵. Die Struktur beinhaltet zwei Kupferionen (Cu^{2+}), ein Kalziumion (Ca^{2+}) und drei Zuckerreste (Asn²³⁹, Asn¹⁸¹⁰, Asn²¹¹⁸). Dargestellt sind außerdem die Aminosäurereste der FVIII-Domänen, die an Interaktionen mit der Phospholipidmembran und mit FIXa beteiligt sind. Die C2-Domäne interagiert über die Reste 2181-2243 und 2248-2312 mit der Phospholipidmembran²⁶. Die A3-Domäne interagiert über die Reste 1899-1903 mit dieser²⁵. Die Phospholipidmembran bindet ebenso mit den Resten 1811-1818 an FIXa²⁷. Die A2-Domäne wiederum interagiert mithilfe der Reste 484-509, 558-565, 698-710 mit FIXa²⁸.

Ist FVIII einmal aktiviert, nimmt die Aktivität rapide ab. Dies ist auf proteolytischen Abbau durch aktiviertes Protein C (APC) und die Dissoziation der A2-Domäne zurückzuführen^{29,30}. APC spaltet FVIIIa innerhalb der A1- und der A2-Domäne und sorgt so für die Inaktivierung von FVIIIa^{31,32}.

1.2 Hämophilie A

Hämophilie A ist eine X-chromosomal rezessiv vererbte Krankheit, die aufgrund von Mutationen innerhalb des FVIII-Gens zum funktionellen Defekt oder zum Fehlen von FVIII führt. Sie tritt mit einer Prävalenz von 1:5000 bis 1:10000 bei männlichen Individuen auf³³. Der Schweregrad der Hämophilie ist abhängig von der FVIII-

Restaktivität im Plasma, wobei <1 % Restaktivität als schwere, 1 bis 5 % Restaktivität als moderate und 6 bis 40 % Restaktivität als milde Hämophilie eingestuft wird^{34,35}. Die FVIII-Restaktivität spiegelt sich wiederum im klinischen Bild der Blutungsneigung wider. Als genetische Ursache können sowohl kleine und große Deletionen, Inversionen, Insertionen, *splice-site*-Mutationen als auch Punktmutationen im FVIII-Gen auftreten. Solche Punktmutationen können entweder aus *missense*- oder *nonsense*-Mutationen bestehen und treten bei etwa 45 % der Patienten auf. Die sogenannte Intron-22-Inversion tritt mit etwa 34 bis 38 % ebenfalls besonders häufig auf. Aufgrund der geringen FVIII-Restaktivität ist diese Mutation bei 40 bis 50 % der Patienten mit einem schweren Verlauf der Krankheit assoziiert^{36,37,38}. Hierbei können spontane Blutungen sowohl in Muskeln als auch in Gelenken, vor allem im Knie, Ellbogen und Fußknöchel auftreten³⁹. Während intramuskuläre Blutungen etwa 10 bis 25 % aller Blutungen ausmachen und zu Nerven- und Gefäßschädigungen führen können, verursachen Gelenkblutungen neben starken Schmerzen auch Unbeweglichkeit und können zur Entzündung der inneren Schicht der Gelenkkapsel (Synovitis) führen⁴⁰. Im schlimmsten Fall münden wiederholt auftretende Blutungen in den sogenannten Zielgelenken in permanenter Unbeweglichkeit und führen somit zur körperlichen Behinderung⁴¹. Das Auftreten zerebraler Blutungen, sowohl spontan als auch in Folge eines Traumas, ist eine der schwersten Folgen der Hämophilie A und kann sowohl zu schweren Schäden als auch zum Tod führen⁴²⁻⁴⁴.

1.2.1 Therapie

Ab den 1950er Jahren wurden Hämophilie-Patienten mit Blut oder frischem Plasma von Spendern behandelt. Trotzdem starben viele Kinder mit schwerer Hämophilie A an den Folgen schwerer Blutungen, vor allem nach Verletzungen oder nach Operationen⁴⁵. Die moderne Hämophilie-Therapie begann in den frühen 1970er Jahren, in welchen erste lyophilisierte Plasma-Präparate für die akute Behandlung und Prophylaxe zur Verfügung standen. In den 1980er Jahren mussten Hämophilie-Patienten jedoch einen schweren Rückschlag in der Therapie erleiden. Etwa 60 bis 70 % der mit den Plasmapräparaten behandelten Patienten infizierten sich durch kontaminierte FVIII-Konzentrate mit dem humanen Immunodefizienzvirus (HIV) und/oder dem Hepatitis C- (HCV) und dem Hepatitis B-Virus (HBV)⁴⁶. Die

anschließende Einführung von Virus-inaktivierenden und weiteren Aufreinigungsmethoden verbesserte die Qualität der Plasma-Präparate deutlich, sodass es in den letzten 25 Jahren zu keiner erneuten Infektion mit HIV, HCV oder HBV durch plasmatische FVIII-Präparate mehr gekommen ist⁴⁵. Ein weiterer Meilenstein in der Behandlung von Hämophilie-Patienten erfolgte im Jahre 1989 durch die Entwicklung rekombinant hergestellter FVIII-Präparate^{47,48}. Patienten mit leichter bis moderater Hämophilie können auch mit Desmopressin behandelt werden, welches den Gehalt von FVIII und vWF im Plasma durch Mobilisierung von endogenen Speichern um das Zwei- bis Vierfache steigen lässt⁴⁹. Patienten mit schwerer Hämophilie erhalten meist prophylaktische intravenöse FVIII-Gaben, um die Gefahr von spontan auftretenden Blutungen zu reduzieren. Patienten mit moderater oder milder Hämophilie erhalten häufig nur im Falle von Blutungen, Verletzungen oder operativen Eingriffen FVIII (*on-demand*-Therapie), da sie aufgrund der körpereigenen FVIII-Restaktivität weniger der Gefahr von spontan auftretenden Blutungen ausgesetzt sind.

Die Behandlung von Hämophilie A-Patienten mit FVIII führte zu einem signifikanten Anstieg der Lebenserwartung von durchschnittlich 11,3 Jahren um 1900 zu derzeit 60-70 Jahren³³. Dies verdeutlicht die lebenswichtige Rolle von FVIII innerhalb des Organismus.

1.2.2 Die Entwicklung einer FVIII-spezifischen Immunantwort

Im Rahmen der FVIII-Substitutionstherapie kommt es bei Patienten mit schwerer Hämophilie A in 25 bis 30 % zu einer inhibitorischen Immunantwort gegen das substituierte Molekül^{50,51}. Da solche Patienten keinen körpereigenen funktionalen FVIII besitzen (Restaktivität <1 %), besteht keine Toleranz gegenüber FVIII, und der Körper erkennt den substituierten FVIII somit als fremdes Molekül. Solche inhibitorischen Antikörper (Inhibitoren) entwickeln sich vor allem in den ersten 10 bis 20 Expositionstagen und stellen derzeit die größte Komplikation in Hämophilie A-Patienten dar, die mit FVIII behandelt werden. Patienten mit milder oder moderater Hämophilie weisen niedrigere Inhibitor-Inzidenzen auf (3 bis 13 %), da die Ausbildung von Toleranz aufgrund des höheren Anteils an körpereigenen FVIII begünstigt ist. Da die FVIII-Inhibitoren aber auch mit endogenem FVIII reagieren, leiden die Patienten teilweise an Symptomen einer schweren Hämophilie A, wie

beispielsweise schweren unkontrollierbaren Blutungen^{52,53}. Das Auftreten von FVIII-Inhibitoren ist aufgrund der auftretenden Blutungen lebensbedrohlich und resultiert in erhöhter Morbidität und Mortalität.

Die primäre Immunantwort gegen FVIII beginnt mit der Internalisierung (Endozytose) des Antigens durch dendritische Zellen, Makrophagen oder B-Zellen (Abbildung 4A). Nach der internen Prozessierung in FVIII-Peptide werden diese zusammen mit *Major Histocompatibility Complex Class II* (MHCII)-Molekülen auf der Oberfläche präsentiert. Die Internalisierung von FVIII durch solche Antigenpräsentierenden Zellen (APZ) ist zum einen von bivalenten Kationen und zum anderen von unterschiedlichen Rezeptoren abhängig. Neben dem Mannose-Rezeptor wird auch die Beteiligung des *low-density lipoprotein receptor-related protein* (LRP) und weiteren Rezeptorassoziierten Proteinen diskutiert⁵⁴⁻⁵⁸. Weiterhin ist die Aufnahme von FVIII in dendritische Zellen von Interaktionen mit der C1- und der C2-Domäne abhängig. Monoklonale Antikörper gegen diese Domänen verhinderten *in vitro* sowohl die Aufnahme durch dendritische Zellen und reduzierten die Immunogenität von FVIII *in vivo*^{59,60}.

CD4⁺ T-Zellen, die mithilfe ihres T-Zellrezeptors (TZR) das auf den APZ präsentierte Peptid-Antigen erkennen, interagieren mit dem MHCII-Peptid-Komplex und werden bei zusätzlicher Interaktion der kostimulatorischen Oberflächenproteine CD40-CD40 Ligand (CD40L) und CD80/86-CD28 aktiviert⁶¹⁻⁶⁵ (Abbildung 4B). Diese Aktivierung induziert die Proliferation und Differenzierung der T-Zelle zu T-Effektor und T-Gedächtniszellen. Weiterhin exprimiert die nun aktivierte T-Effektorzelle, vermehrt die Oberflächenproteine CD2, CD30, CD40, CD40L und CD28 und wandert von den periarteriolen lymphatischen Scheiden zu den B-Zellfollikeln in der Milz^{66,67}. Hier erkennt die T-Effektorzelle mithilfe ihres TZR ein FVIII-Peptid, das auf der Oberfläche naiver B-Zellen ebenfalls in Komplex mit MHCII präsentiert wird. B-Zellen agieren, wie oben beschrieben, ebenfalls als APZ und haben FVIII zuvor mithilfe ihres BZR spezifisch gebunden und internalisiert. Um die B-Zelle zu aktivieren, müssen neben dem TZR-Peptid-MHCII-Komplex noch weitere Oberflächenmoleküle, wie CD2-LFA-3, CD40L-CD40, CD28-CD80/86 und CD30-CD30L miteinander interagieren (Abbildung 4C).

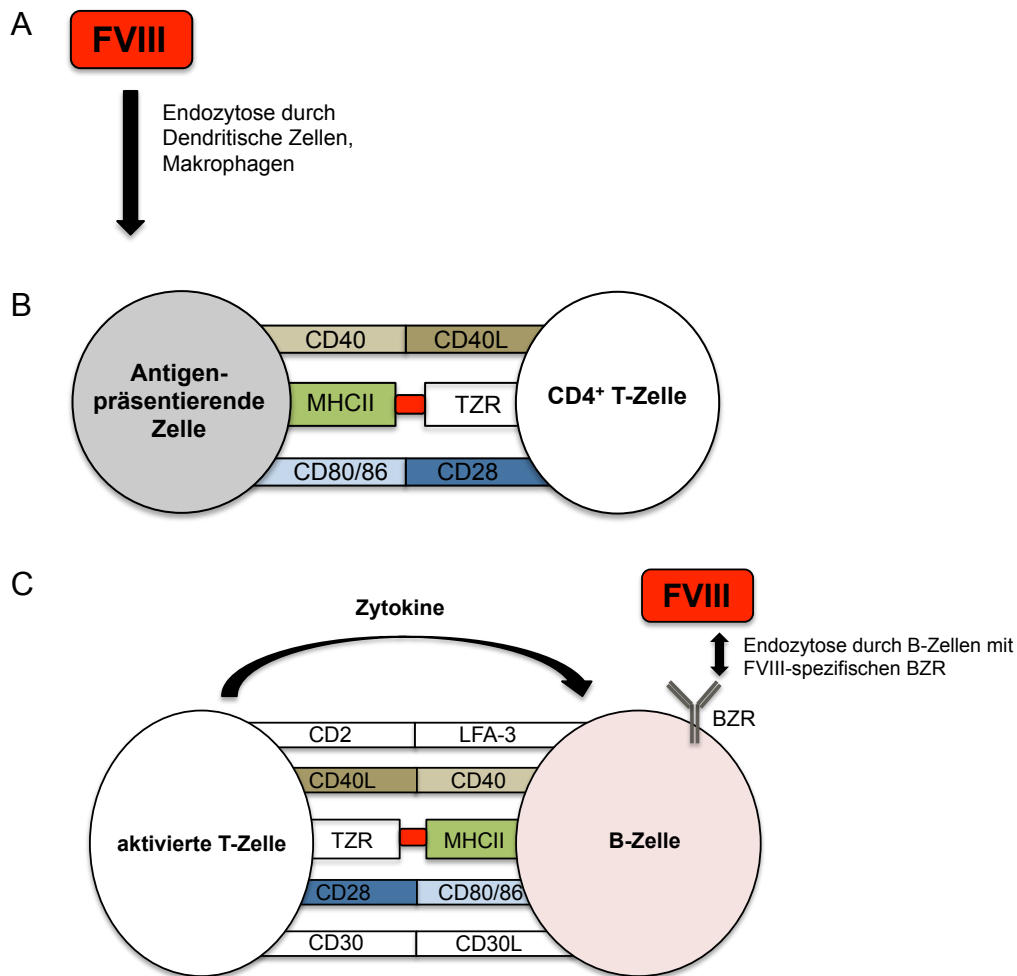


Abbildung 4: Die Entwicklung einer FVIII-spezifischen Immunantwort. Abbildung modifiziert nach White *et al.*⁶². (A) Das Antigen (FVIII) wird durch dendritische Zellen, Makrophagen und B-Zellen internalisiert und prozessiert. (B) FVIII-Peptide werden anschließend auf der Antigenpräsentierenden Zelle (APZ) in Komplex mit MHCII präsentiert, sodass CD4⁺ T-Zellen mithilfe ihres T-Zellrezeptors (TZR) das FVIII-Peptid spezifisch erkennen können und mithilfe dieser Interaktion und weiterer kostimulatorischer Oberflächenmoleküle aktiviert werden. (C) Die aktivierte T-Effektorzelle interagiert wiederum mittels derselben und weiterer Oberflächenproteine mit naiven B-Zellen, die ebenfalls ein FVIII-Peptid in Komplex mit MHCII auf der Oberfläche präsentieren. Die naive B-Zelle hatte FVIII zuvor durch den B-Zellrezeptor spezifisch gebunden und internalisiert.

Dies und die Ausschüttung von Zytokinen durch die T-Effektorzelle führt letztendlich zur Expansion und zur Proliferation der naiven B-Zelle und der Differenzierung in IgM-produzierende Antikörper-sekretierende Plasmazellen (ASZ) und Gedächtnis-B-Zellen⁶⁸⁻⁷⁰. Im Zuge der primären Immunantwort können auch schon IgG-sekretierende ASZ durch Klassenwechsel ausgebildet werden. Der Hauptanteil von Antikörpern während der primären Hämostase ist jedoch IgM.

Die Gedächtnis-B-Zellen werden zuvor einer Affinitätsmaturierung durch somatische Hypermutation unterzogen. Durch den Austausch einzelner Nukleotide in den variablen Domänen mithilfe der *Activation-induced Cytidine Deaminase* (AID) und klonaler Selektion kommt es zur Erhöhung der Affinität gegenüber dem Antigen und

zum Klassenwechsel von IgM zu IgG. Kommt die gereifte B-Zelle erneut mit FVIII in Kontakt, wird dieser von der Gedächtnis-B-Zelle mithilfe des BZR wieder internalisiert und FVIII-Peptide werden auf der Oberfläche präsentiert. Durch die bereits beschriebenen Interaktionen mit aktivierten T-Effektorzellen kommt es zur Ausbildung von Antikörper-sekretierenden Plasmazellen, die allerdings aufgrund der vorangegangenen Affinitätsreifung und des Klassenwechsels affinere IgG-Antikörper sekretieren (sekundäre Immunantwort). Die Mechanismen der sekundären Immunantwort laufen allerdings wesentlich schneller ab als die der primären Immunantwort (Abbildung 5).

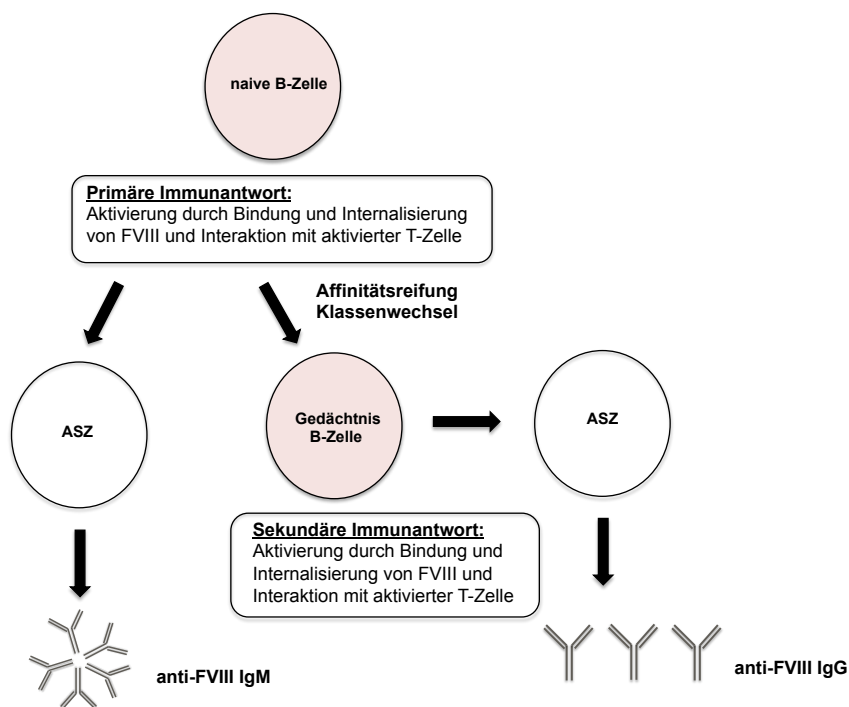


Abbildung 5: Primäre und sekundäre Immunantwort gegen FVIII. Modifizierte Darstellung aus Georgescu *et al.*⁷¹. Die naive B-Zelle wird durch die Mechanismen aus **Abbildung 4** aktiviert und differenziert zunächst zur IgM-produzierenden Antikörper-sekretierenden Plasmazelle (ASZ). Während der primären Hämostase kann es auch schon zur Ausbildung von IgG-produzierenden ASZ kommen (hier nicht dargestellt). Weiterhin kann die naive B-Zelle einer Affinitätsreifung sowie einem Klassenwechsel unterzogen werden und zur Gedächtnis-B-Zelle differenzieren. Kommt die Gedächtnis-B-Zelle erneut mit FVIII und mit FVIII-aktivierten T-Effektorzellen in Kontakt, differenzieren sich IgG-produzierende ASZ aus.

Die Frequenz von FVIII-spezifischen Gedächtnis-B-Zellen im Blut von Hämophilie A-Patienten mit Inhibitoren liegt bei etwa <math><0.01</math> bis 0.4 % aller IgG-positiven B-Zellen. Hierbei korreliert der Anteil nicht etwa mit der Höhe der Immunantwort, sondern mit der zeitlichen Nähe des letzten Antigenkontakts⁷².

1.2.2.1 Der B-Zellrezeptor

Der BZR befindet sich auf der Oberfläche reifer B-Zellen. Er besteht aus einem Antigen-spezifischen Teil, dem membranständigen Immunglobulin (mIg) und weiteren Membranproteinen. Das mIg besteht, wie sekretierte Antikörper auch, aus zwei schweren (IgH) und zwei leichten Ketten (IgL). Die schweren Ketten sind jedoch noch um eine Membran-durchspannende Domäne ergänzt. Das mIg interagiert mit den zwei Membranproteinen CD79a und CD79b, die für die Signalübertragung verantwortlich sind (Abbildung 6). Diese bestehen wiederum aus einer extrazellulären Ig-Domäne, einer Transmembran-Region (TM) und einem zyttoplasmatischen Teil, welcher ein *immunoreceptor tyrosine-based activation motif* (ITAM) beinhaltet.

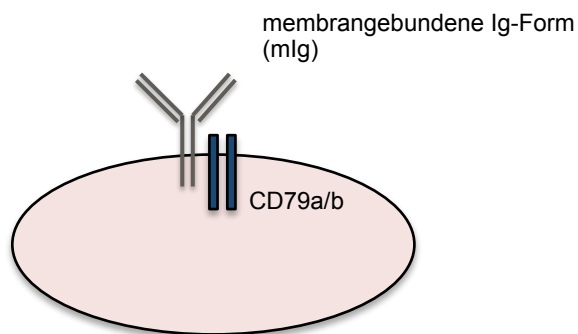


Abbildung 6: Schematischer Aufbau des B-Zellrezeptors

Der BZR unterscheidet zwischen tonischen Signalen, welche für das Überleben während der Ruhephasen notwendig sind, und Aktivierungssignalen, welche zur B-Zellaktivierung und -proliferation führen. Generell wird davon ausgegangen, dass die Bindung eines Antigens zur Clusterbildung der BZRs und zur Internalisierung des Antigens führt. Dennoch ist unklar, welche Voraussetzungen für das Clustering geschaffen werden müssen und ob das Clustering überhaupt für die Aktivierung notwendig ist⁷³. Wird ein Antigen mithilfe von mIg gebunden, wird das ITAM der Korezeptoren CD79a und CD79b mithilfe der Lyn-Kinase phosphoryliert. Diese Stimulation führt über verschiedene Signalwege zur spezifischen Genexpression mithilfe mehrerer Transkriptionsfaktoren. Hier ist zu beachten, dass die Signalübertragung und Antigen-Internalisierung zwei voneinander unabhängige Ereignisse sind. Der BZR-Antigen-Komplex wird über Clathrin-abhängige Vertiefungen endozytiert. Die genauen molekularen Voraussetzungen für die

Internalisierung sind bisher nicht hinreichend geklärt⁷⁴⁻⁷⁶. Eine BZR-Signalübertragung ist für die Internalisierung von BZR-Antigen-Komplexen nicht notwendig, jedoch für die Lenkung des Komplexes in die richtigen endozytotischen Kompartimente. Generell beeinflusst auch die Beschaffenheit des gebundenen Antigens die Mechanismen der Internalisierung⁷⁴.

1.2.3 Erworbene Hämophilie A

Auch Patienten mit intaktem endogenem FVIII können eine inhibitorische Immunantwort gegen den körpereigenen FVIII entwickeln, allerdings ist dieses Auftreten sehr selten (Inzidenz ca. 1,3/Million/Jahr). Dies resultiert in einer Autoimmunerkrankung, die als erworbene Hämophilie A (engl. *acquired hemophilia A*, AHA) bezeichnet wird und vor allem bei älteren Menschen (>60 Jahre) auftritt^{77,78}. AHA kann mit weiteren Immunerkrankungen wie Rheumatoider Arthritis und Lupus erythematoses assoziiert sein. Weiterhin können solche Inhibitoren auch im Zuge einer Schwangerschaft oder diversen Hauterkrankungen (Pemphigoid) auftreten. Bei etwa der Hälfte der Patienten kann keine zugrundeliegende Ursache identifiziert werden. Etwa 70 % der Patienten benötigen eine hämostatische Behandlung, wobei hier in der Regel nicht FVIII-Präparate, sondern *bypassing*-Medikamente, wie aktivierter FVII oder aktivierter Prothrombinkomplex verwendet werden^{79,80}. Alternativ können Patienten auch porcinen FVIII (pFVIII) erhalten, der bei fehlender Kreuzreaktivität der endogenen Inhibitoren die Hämostase wiederherstellt⁸¹. Zur Eradikation der FVIII-Inhibitoren in solchen Patienten werden vor allem immunsuppressive Strategien, wie die Gabe von Steroiden, Zytotoxinen oder die Behandlung mit Rituximab angewandt^{82,83}. Wie auch bei Patienten mit angeborener Hämophilie können die durch die inhibitorische Immunantwort verursachten Blutungen in AHA-Patienten lebensbedrohlich sein⁸³.

1.2.4 Klassifizierung von FVIII-Inhibitoren

Beim Auftreten von FVIII-Inhibitoren wird der Inhibitor-Titer in Bethesda-Einheiten pro ml (BU/ml) quantifiziert. Eine Bethesda-Einheit entspricht einer Inhibitormenge, welche die Faktor-VIII-Aktivität eines Normalplasmapools um 50 % reduziert⁸⁴. Patienten mit einem Inhibitor-Titer über 5 BU/ml gelten als sogenannte *high responder*, welche mit sogenannten *bypassing*-Medikamenten wie aktiviertem FVII

und aktiviertem Prothrombinkomplex (z. B. FEIBA) behandelt werden, da infundierter FVIII durch die Inhibitoren umgehend neutralisiert wird. Patienten mit 0,6-5 BU/ml gelten als *low responder*, bei ihnen kann die Behandlung weiterhin mit FVIII erfolgen. In diesem Fall kann die inhibitorische Wirkung durch entsprechende Mengen von FVIII überspielt werden. Patienten mit einem Inhibitortiter unter 0,6 BU/ml gelten als Inhibitor-negativ⁸⁵.

Inhibitor-Patienten weisen oft Typ-I-Inhibitoren auf, welche eine lineare, dosisabhängige Inhibition von FVIII aufweisen und die Aktivität von FVIII vollständig inhibieren können. Patienten mit erworbener Hämophilie A (siehe 1.2.3) weisen auch Inhibitoren des Typs II auf, die einer komplexeren Kinetik folgen und FVIII nicht vollständig inhibieren. Solche Typ-II-Inhibitoren treten auch häufig bei Patienten mit milder oder moderater Hämophilie A auf.

Die humorale Immunantwort gegen FVIII ist nicht auf bestimmte Subklassen beschränkt, denn obwohl vor allem Antikörper der Subklassen IgG1 und IgG4 besonders häufig vorkommen, konnten auch die Subklassen IgG2 und IgG3 detektiert werden^{86,87}. Während IgG1 sowohl in *low* als auch *high responders* vorkommt, zirkulieren hoch-affine FVIII-neutralisierende IgG4-Antikörper vor allem in *high responders* in hohen Konzentrationen^{87,88}. Antikörper der Subklasse IgG4 besitzen die Möglichkeit, mit anderen IgG4-Antikörpern den Fab-Arm auszutauschen. So werden neue bispezifische Antikörper generiert, die daher nicht in der Lage sind, zusammen mit dem Antigen Immunkomplexe zu bilden. Da sie außerdem weder komplementaktivierend wirken noch an Fc-Rezeptoren binden, werden sie eigentlich mit anti-inflammatorischen Immunantworten assoziiert⁸⁹.

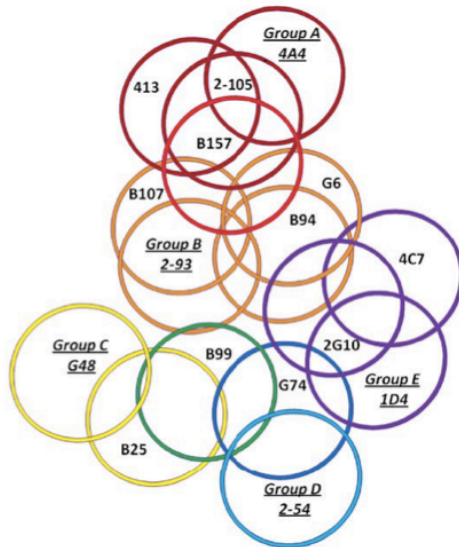
FVIII-spezifische Antikörper inhibieren zum einen die Funktion von FVIII, indem sie die Interaktion mit der Phospholipidmembran oder FIX behindern oder verkürzen die Halbwertszeit, indem sie die Bindung von FVIII an vWF blockieren. Zusätzlich konnten auch proteolytische Antikörper nachgewiesen werden, die in der Lage sind, FVIII zu spalten und auf diese Weise die Funktion des Gerinnungsfaktors zu inhibieren⁹⁰. In Gesunden und auch in Hämophilie A-Patienten ohne Inhibitoren konnten auch nicht-inhibitorische Antikörper detektiert werden, deren Affinitäten allerdings 100mal niedriger waren als die von inhibitorischen Antikörpern^{88,91-94}.

Die FVIII-spezifische Immunantwort ist zwar polyklonal, dennoch ist sie hauptsächlich gegen die 40 kDa A2- und die 15 kDa C2-Domäne gerichtet, da auf diesen beiden Domänen besonders immundominante Bereiche liegen⁹⁵⁻¹⁰². In der Vergangenheit konnten jedoch auch Antikörper detektiert werden, die gegen die A1-, die A3- und die C1-Domäne gerichtet sind. Hierbei existieren auch solche, die sowohl die A1- als auch die A3-Domäne binden^{103,104}.

Die A2-Domäne von FVIII interagiert mit FIX und FX^{105,106}. Verschiedene Arbeiten haben sich mit der Identifikation von Inhibitorepitopen innerhalb der A2-Domäne mithilfe monoklonaler Antikörper aus Mäusen beschäftigt¹⁰⁷⁻¹⁰⁹. Mittels eines kompetitiven *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) sowie *homolog-scanning mutagenesis* konnten die Epitope der untersuchten Antikörper innerhalb der A2-Domäne zugeordnet und die Antikörper folglich in die Gruppen A, AB, B, BCD, C, D, DE und E eingeteilt werden¹⁰⁷ (Tabelle 4, Anhang). Antikörper der Gruppe A erkennen vor allem ein N-terminales Epitop innerhalb der A2-Domäne (Arg484-Ile508). Die Bindung innerhalb dieses Bereichs weist auf eine Bindung an aktivierten FVIII und einer daraus resultierenden nicht-kompetitiven Inhibition des Tenase-Komplexes hin¹¹⁰. Im Gegensatz zu den Antikörpern der Gruppe A weisen Antikörper der Gruppe AB, B, BCD und C eine geringe bis keine inhibitorische Aktivität auf. Gruppe D und E Antikörper erkennen Epitope in der C-terminalen Region der A2-Domäne. Damit inhibieren sie teilweise die Aktivierung von FVIII durch Thrombin an Arg372 und die Spaltung der leichten Kette an Arg1689, was wiederum die Dissoziation von FVIII und vWF verhindert¹⁰⁷.

Meeks *et al.* haben mithilfe desselben Vorgehens Epitope innerhalb der C2-Domäne charakterisiert¹¹¹. C2-spezifische Antikörper können sowohl die Interaktion von FVIII mit der Phospholipidmembran und vWF blockieren, als auch die Bindung an FX und die Spaltung durch Thrombin^{111,112}. Die C2-spezifischen Antikörper konnten mithilfe der unterschiedlichen Epitope in fünf Gruppen eingeteilt werden (A, AB, B, BC, C). Insgesamt besitzen die in die Gruppen eingeteilten Antikörper 18 teilweise überlappende Epitope (Abbildung 7).

A



B



Abbildung 7: Venn-Diagramme der Epitope von A2- und C2-spezifischen Antikörpern. Jeder Antikörper wurde mithilfe von Kompetitions-ELISAs einer der Gruppen zugeordnet. (A) adaptiert aus Markovitz *et al.*¹⁰⁷. Gruppe A (dunkelrot), Gruppe AB (rot), Gruppe B (orange), Gruppe C (gelb), Gruppe BCD (grün), Gruppe D (hellblau), Gruppe DE (blau), Gruppe E (lila). (B) adaptiert aus Meeks *et al.*¹¹¹. Gruppe A (rot), Gruppe AB (orange), Gruppe B (gelb), Gruppe BC (grün), Gruppe C (blau), Epitop des humanen Inhibitors BO2C11 (weiß).

Folglich ist die Immunantwort gegen FVIII nicht nur gegen einen bestimmten Bereich des Moleküls, sondern gegen eine Reihe unterschiedlicher Epitope, vor allem innerhalb der A2- und der C2-Domäne, gerichtet.

1.2.5 Risikofaktoren für die Entwicklung von FVIII-Inhibitoren

Wie bereits beschrieben, hat die Schwere der Hämophilie einen Einfluss auf das Risiko, FVIII-Inhibitoren zu entwickeln. Warum allerdings einige Patienten FVIII-Inhibitoren entwickeln und andere nicht, ist bisher nicht hinreichend geklärt.

Grundsätzlich kann man in genetische und nicht-genetische Faktoren unterscheiden.

Die jeweilige FVIII-Mutation beeinflusst die Entwicklung von Inhibitoren, da von ihr abhängt, wie groß der Anteil des FVIII-Moleküls ist, der bei Substitution als fremd erkannt wird¹¹³. Etwa 88 % der Patienten mit großen, mehrere Domänen umfassende Deletionen entwickeln Inhibitoren, wobei Mutationen, die zwar zum Verlust von funktionalem FVIII führen aber dennoch in der Produktion von vollständigem FVIII resultieren, nur mit einem geringen Risiko der Inhibitorentwicklung assoziiert sind (3-10 %). Bei Patienten mit der häufigsten Intron-22-Inversion liegt die Inhibitorinzidenz bei 21 %¹¹⁴⁻¹¹⁷. Weiterhin wird auch der HLA-Typ (engl. *human leukocyte antigen*) als möglicher Einfluss diskutiert, da von ihm

abhängt, welche FVIII-Peptide auf der Oberfläche der APZ in Komplex mit MHCII präsentiert werden. Hier wird eine erhöhte Prävalenz zur Entwicklung von FVIII-Inhibitoren bei Patienten mit den HLA-Typen DRB1*1501, DQA1*0102 und DQB1*0602 in Erwägung gezogen^{118,119}. Es ist ebenfalls zu beachten, dass das Zusammenspiel von HLA-Typ und zugrunde liegender FVIII-Mutation die Entwicklung einer Immunantwort beeinflusst. Neben den HLA-Typen wurde auch der Zusammenhang zwischen Polymorphismen in den Genen von IL-10, TNF α und CTLA-4 diskutiert¹²⁰⁻¹²².

Es konnte außerdem bereits gezeigt werden, dass Patienten afrikanischer oder hispanischer Herkunft ein höheres Risiko der Inhibitorentwicklung aufweisen¹²³. Weiterhin spielt auch die Familienhistorie eine entscheidende Rolle, denn das Risiko einer Inhibitorentwicklung ist in Familien, bei denen schon einmal Inhibitoren aufgetreten sind, wesentlich höher¹²⁴.

Als nicht-genetische Ursache kann die Intensität der ersten FVIII-Therapie den Verlauf einer Inhibitorentwicklung begünstigen¹²⁵⁻¹²⁷. Hierbei spielen vor allem die Häufigkeit der FVIII-Expositionen und/oder die Behandlung vor bzw. bei einem operativen Eingriff eine Rolle. Letzteres geht einher mit dem sogenannten *danger model* von Polly Matzinger. Dieses besagt, dass geschädigtes Gewebe immunstimulierende Alarmsignale freisetzt, welche dafür sorgen, dass der Körper den aufgrund des Gewebeschadens substituierten FVIII mit dem Schaden selber assoziiert und deshalb inhibitorische Antikörper bildet¹²⁸.

Bei der Behandlung von Hämophilie A-Patienten hat man generell die Wahl zwischen plasmatischen und rekombinanten FVIII-Präparaten. Vergleiche in der Immunogenität der Produkte lieferten bisher keine eindeutigen und teilweise gegensätzliche Ergebnisse^{51,129,130}. Generell können sowohl die Zusammensetzung der Aminosäuresequenz, die in plasmatischen Produkten variieren kann als auch posttranslationale Modifikationen einen Einfluss auf die Immunogenität haben. Ebenfalls diskutiert wird die Neigung zur Bildung von Aggregaten sowie die Anwesenheit von vWF in plasmatischen Präparaten¹³¹. Tabelle 1 fasst die Risikofaktoren für die Inhibitorentwicklung zusammen.

Tabelle 1: Risikofaktoren für die Entwicklung von FVIII-Inhibitoren (modifiziert nach Witmer et al.¹³²).

Genetisch	<ul style="list-style-type: none">- Art der Mutation- Familienhistorie- Ethnie- Polymorphismen in immunassoziierten Genen (MHCII, IL-10, TNFα, CTLA-4)
Behandlungsbezogen	<ul style="list-style-type: none">- Intensität (operativer Eingriff, Häufigkeit)- FVIII-Präparat (plasmatisch vs. rekombinant)- zeitlicher Beginn der Prophylaxe- Produktwechsel

1.2.6 Therapie von Inhibitor-Patienten

1.2.6.1 Immuntoleranz-Therapie (ITI)

Die sogenannte Immuntoleranz-Therapie (engl. *immune tolerance induction therapy*, ITI) ist bisher die einzige etablierte Therapie, die zu einer dauerhaften Eradikation der FVIII-Inhibitoren und Induktion von Toleranz gegenüber FVIII führen kann. Die Therapie beruht auf der meist täglichen Gabe hoher FVIII-Dosen, welche sich, je nach Behandlungsdauer, über Wochen bis hin zu Jahren erstrecken kann. Neben der Tatsache, dass die Therapie sehr teuer und aufwendig ist, ist vor allem die Lebensqualität der Patienten stark beeinträchtigt. Generell gibt es mehrere anwendbare Therapie-Protokolle, die sich in der FVIII-Dosis, Behandlungshäufigkeit und dem Zusatz immunsupprimierender Medikamente unterscheiden¹³³⁻¹³⁵. Die erfolgreiche Eradikation von FVIII-Inhibitoren zeichnet sich klinisch durch eine normale FVIII-Halbwertszeit, FVIII-Wiederfindung und nicht mehr detektierbaren Inhibitoren im Plasma aus. Leider ist die ITI bei etwa 30 % der Patienten nicht erfolgreich, wobei hier der Inhibitor-Titer vor Beginn der ITI, der historisch höchste Titer und der höchste Titer während der ITI Faktoren sind, die den Verlauf der Therapie beeinflussen können¹³⁶.

Das Auftreten verschiedener IgG-Subklassen vor und während der ITI wurde bereits als möglicher prognostischer Marker für den ITI-Verlauf untersucht¹³⁷. Hierbei ergab sich eine Korrelation zwischen dem Auftreten von IgG4-Antikörpern und einem längeren Verlauf bis zur Toleranzinduktion. Ähnlich wie bei den Risikofaktoren für die Entwicklung von Inhibitoren, wird auch die Verwendung verschiedener FVIII-Präparate hinsichtlich Typen und Reinheit diskutiert.

Die Mechanismen der Toleranzinduktion durch die hochfrequente Behandlung mit hohen FVIII-Dosen sind bisher nicht aufgeklärt. Gilles *et al.* postulierten, dass die Inhibition von anti-FVIII Antikörpern während der ITI möglicherweise durch die Induktion von anti-idiotypischen Antikörpern hervorgerufen wird¹³⁸. Solche anti-idiotypischen Antikörper interagieren sowohl mit dem Paratop der Inhibitoren als auch den mlg auf den FVIII-spezifischen B-Zellen. Letzteres könnte anschließend zur Inhibition der Restimulation führen. Inwieweit diese Inhibition reguliert und die entstandene Immuntoleranz aufrechterhalten wird, muss noch untersucht werden. Die Induktion von regulatorischen T-Zellen (T_{regs}) und die damit verbundene FVIII-spezifische Immunsuppression ist eine weitere diskutierte Möglichkeit für die Toleranzinduktion während der ITI¹³⁹.

Während der Etablierung der Immunantwort werden neben den Gedächtnis-B-Zellen auch $CD4^+$ Gedächtnis-T-Zellen sowie ASZ entwickelt. Für eine erfolgreiche ITI müssen alle diese Zellen inaktiviert bzw. eliminiert werden. Während B- und T-Zellen antigenspezifische Rezeptoren exprimieren, werden diese bei der Differenzierung von Gedächtnis-B-Zellen zu ASZ nicht mehr exprimiert¹⁴⁰. Grundsätzlich wird davon ausgegangen, dass die ITI durch Überstimulation bei FVIII-spezifischen B-Zellen Apoptose induziert.

Trotz erfolgreich abgeschlossener ITI treten bei etwa 32,5 % der Patienten nach fünf Jahren wieder FVIII-Inhibitoren auf¹⁴¹. Dies zeigt, dass das Immunsystem wiederholt in der Lage ist, eine FVIII-spezifische Immunantwort auszubilden. Wahrscheinlicher ist allerdings, dass während der ITI nicht alle FVIII-spezifischen B-Zellen erreicht und eliminiert worden sind.

1.2.6.2 Weitere Therapie-Möglichkeiten

Bei Versagen der ITI können die Patienten mit den bereits erwähnten *bypassing*-Medikamenten, wie aktiviertem Prothrombinkomplex oder aktiviertem FVII behandelt werden. Dies führt bei akut auftretenden Blutungen zwar zur Blutstillung, jedoch ist die Behandlung sehr teuer und weniger effektiv als die Behandlung mit FVIII. Weiterhin kann es zu Thrombosen kommen, was den Einsatz dieser Medikamente zur Blutungsprophylaxe bei Inhibitorpatienten erschwert.

Alternativ können Patienten auch rekombinanten B-Domänen-freien porcinen FVIII (pFVIII) erhalten, der bei fehlender Kreuzreaktivität mit endogenen Inhibitoren die Hämostase wiederherstellen kann^{81,142,143}. Jedoch ist auch bei der Behandlung mit pFVIII die Entwicklung von Inhibitoren nicht ausgeschlossen¹⁴⁴. In der klinischen Erprobung mit vielversprechenden Ergebnissen befindet sich gerade der bispezifische Antikörper Emicizumab (ACE910). Dieser ersetzt die Funktion von FVIII gänzlich, indem er FIXa und FX bindet und so in räumliche Nähe bringt, dass es zur Aktivierung von FX und somit zur Generierung von Thrombin kommt. Vorteile von Emicizumab sind, dass er seine Wirkung trotz bestehender FVIII-Inhibitoren entfalten kann und außerdem eine wesentlich längere Halbwertszeit besitzt als FVIII¹⁴⁵. Erste Daten aus der Phase III-Studie HAVEN 1 der Firma Roche zeigen jedoch, dass die Behandlung mit Emicizumab zusammen mit aktiviertem Prothrombinkomplex auch zu Thrombosen führen kann.

Neben der ITI ist der Einsatz von Rituximab eine weitere Möglichkeit zur Eradikation von FVIII-Inhibitoren. Rituximab ist ein monoklonaler CD20-spezifischer Antikörper, der mittels Antikörper-abhängiger zellvermittelter Zytotoxizität (ADCC) und komplementabhängiger Toxizität (CDC) in der Lage ist, CD20⁺ B-Zellen zu eliminieren. CD20 ist ein Antigen, das auf der Oberfläche von B-Zellen exprimiert wird. Da durch Gabe von Rituximab die Depletion des B-Zell-basierten Immunsystems erfolgt, kann die Behandlung mit vielfältigen oft schweren Nebenwirkungen wie beispielsweise schweren Infektionen assoziiert sein. Obwohl Rituximab auch die FVIII-spezifischen B-Zellen eliminiert, können bei erneuter FVIII-Exposition nochmals FVIII-Inhibitoren auftreten.

1.2.6.3 Präklinische Ansätze

Da die Entwicklung von FVIII-Inhibitoren immer noch die schwerwiegendste Komplikation bei der FVIII-Substitutionstherapie von Hämophilie A-Patienten darstellt, wird fortwährend an Diagnoseverfahren zur genaueren Charakterisierung der Immunantwort und neuen therapeutischen Ansätzen gearbeitet. Neue Ansätze beschäftigen sich zum einen mit der Heilung von Hämophilie A mittels Gentherapie, wobei hier die endogene FVIII-Produktion mithilfe von nicht-viralen, Adeno-assoziierten oder lentiviralen Vektoren etabliert werden soll¹⁴⁶. Zum anderen werden sowohl Ansätze zur Prävention der Entwicklung von FVIII-Inhibitoren als auch alternativen Methoden für die Eradikation von FVIII-Inhibitoren verfolgt.

Lei *et al.* haben naive B-Zellen mit Vektoren transfiziert, die jeweils eine genetische Fusion aus C2- oder A2-Domäne und IgG enthielt. Die Behandlung von FVIII-immunisierten FVIII^(-/-)-Mäusen mit den transduzierten B-Zellen führte zu einer signifikanten Reduktion der Immunantwort¹⁴⁷. Dies zeigt, dass auch B-Zellen eine Rolle bei der Induktion von Toleranz spielen¹⁴⁸. Die Entwicklung von FVIII-Molekülen mit weniger immunogenen T- und B-Zellepitopen ist eine weitere Möglichkeit, die Wahrscheinlichkeit einer FVIII-spezifischen Immunantwort zu senken⁹⁹.

Wie bereits beschrieben, wurde die Induktion von anti-Idiotypen während der ITI als mögliche Ursache der Toleranzinduktion diskutiert. In der Vergangenheit haben wir bereits erfolgreich anti-idiotypische Antikörperfragmente aus Phagenbibliotheken isolieren können¹⁴⁹. Die jeweils selektierten *single-chain variable fragments* (scFvs) wurden für murine monoklonale FVIII-Inhibitoren selektiert und waren in der Lage, diese *in vitro* und auch *in vivo* in FVIII-*knockout* (FVIII^(-/-))-Mäusen zu neutralisieren und so die FVIII-Aktivität wiederherzustellen¹⁵⁰. Leider wiesen die scFvs weder eine Kreuzreaktivität mit weiteren monoklonalen FVIII-Inhibitoren noch mit FVIII-Inhibitoren aus Patientenplasma auf. Dies verdeutlicht, wie vielfältig die FVIII-spezifische Immunantwort ist, obwohl sie sich auf bestimmte FVIII-Domänen konzentriert (siehe auch 1.2.4).

Es existieren verschiedene Ansatzpunkte, an denen entweder in die Entwicklung der oder in die bereits etablierte FVIII-spezifische Immunantwort eingegriffen werden kann. Wichtige Zielstrukturen sind hier die APZ, die FVIII aufnehmen und

prozessieren, sowie die FVIII-spezifischen T- und B-Zellen. Zur Induktion von T-Zelltoleranz kann etwa die Reifung von dendritischen Zellen zu tolerogenen dendritischen Zellen mittels viraler Transduktion gefördert werden. Dies führte bereits zu einer Reduktion der FVIII-spezifischen Immunantwort in FVIII^(-/-)-Mäusen^{151,152}. Weiterhin konnte auch gezeigt werden, dass die orale Gabe von in Pflanzenzellen eingekapselten FVIII die Formation einer Immunantwort reduziert¹⁵³. Hierbei erfolgt die orale Induktion von Toleranz durch das Immunsystem der gastrointestinalen Mukosa¹⁵⁴.

T_{regs} spielen eine zentrale Rolle in der Regulation von protektiven Immunantworten und der Induktion bzw. Aufrechterhaltung von Toleranz (siehe auch 1.2.6.1). Hierzu konnte bereits gezeigt werden, dass ein adoptiver Transfer polyklonaler sowie FVIII-spezifischer T_{regs} die FVIII-spezifische Immunantwort reduziert und außerdem weitere endogene T_{regs} induziert¹⁵⁵⁻¹⁵⁷. Da beim Transfer von T_{regs} mit nicht definierter Spezifität die Gefahr einer systemischen Immunsuppression besteht, entwickelten Yoon und Schmidt *et al.* einen FVIII-spezifischen chimären Antigen-Rezeptor (CAR). Mit diesem CAR transduzierte T_{regs} inhibierten sowohl die Proliferation humaner T-Zellen *in vitro* als auch die Restimulation FVIII-spezifischer B-Zellen in FVIII^(-/-)-Mäusen¹⁵⁸. Eine weitere Möglichkeit der Eradikation von FVIII-Inhibitoren ist die Inhibition der Restimulation FVIII-spezifischer Gedächtnis-B-Zellen. Hier konnten Hausl *et al.* zeigen, dass die Blockade der Interaktion der kostimulatorischen Moleküle CD28 und CD40L die Restimulation verhindert¹⁵⁹.

Die Behandlung mit Rituximab führte bereits zur Eradikation von FVIII-Inhibitoren. Allerdings entwickelte sich auch hier in einigen Patienten, ähnlich wie bei Patienten mit einer erfolgreichen ITI, eine erneute FVIII-spezifische Immunantwort¹⁶⁰. Dies zeigt, dass die Eliminierung FVIII-spezifischer Gedächtnis-B-Zellen für die Eradikation der FVIII-Inhibitoren zwar notwendig ist, dies allerdings nicht verhindert, dass naive B-Zellen bei erneuter FVIII-Exposition zu neuen FVIII-spezifischen Gedächtnis-B-Zellen differenzieren können.

Dennoch gilt die selektive Eliminierung FVIII-spezifischer B-Zellen als wichtiger Ansatzpunkt bei der Eradikation von FVIII-Inhibitoren. Hierbei ist die spezifische Ansteuerung des mlg innerhalb des BZR eine mögliche Option zur Eliminierung der Gedächtnis-B-Zellen. Frühere Studien von Markovitz *et al.* konnten bereits zeigen,

dass die Anwendung von kovalent an ein pflanzliches Proteintoxin gekoppeltem FVIII zur Eliminierung von FVIII-Inhibitoren in FVIII^(-/-)-Mäusen führte¹⁶¹. Das verwendete Protein Saporin führt innerhalb der Zelle zum Abbruch der Proteinbiosynthese. Zunächst bekamen FVIII^(-/-)-Mäuse mehrere Wochen lang in wöchentlichem Abstand FVIII gespritzt, sodass diese eine FVIII-spezifische Immunantwort entwickelten. Die somit immunisierten Tiere wurden in drei Behandlungsgruppen aufgeteilt. Eine Gruppe erhielt das FVIII-Toxin, die zweite erhielt nur FVIII und die dritte erhielt das ungekoppelte Toxin. Anschließend wurde die Milz isoliert, die Splenozyten wurden von CD138⁺ Antikörper-sekretierenden Plasmazellen befreit und diese in naive FVIII^(-/-)-Mäuse gegeben. Nach erneuter FVIII-Gabe wurden in denjenigen Mäusen, die Splenozyten der FVIII-Toxin behandelten Tiere erhielten, keine Antikörper detektiert. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Behandlung naiver FVIII^(-/-)-Mäuse mit FVIII-Toxin die Entwicklung FVIII-spezifischer B-Zellen verhinderte. Obwohl hier die selektive Ansteuerung FVIII-spezifischer B-Zellen gewährleistet ist, birgt die Verwendung von FVIII als zellbindende Komponente doch Probleme und einige Risiken. FVIII ist mit 250 kDa ein großes Protein und reagiert wiederum mit vWF. Durch die Interaktion von vWF mit weiteren natürlichen Bindungspartnern, kann es daher zu Nebenwirkungen durch Wechselwirkungen mit gesundem Gewebe führen. Nichtsdestotrotz ermöglicht die Verwendung von Immuntoxinen die selektive Eliminierung FVIII-spezifischer B-Zellen und somit die Eradikation von FVIII-Inhibitoren.

1.3 *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A

Das Proteintoxin Exotoxin A stammt aus dem gram-negativen Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* und besitzt hohes zytotoxisches Potenzial. Die 638 Aminosäuren lange Polypeptidkette ist in strukturell und funktionell unterschiedliche Domänen unterteilt. Während die N-terminale Domäne Ia (1-252) für die Bindung der Zielzelle verantwortlich ist, ist die Aufgabe der Domäne Ib (365-404) nicht genau bekannt. Domäne II (253-364) ist wiederum für die Translokation des Toxins über die Zellmembran verantwortlich. Die katalytische Untereinheit, welche auch letztendlich die toxische Wirkung entfaltet, besteht aus den letzten vier Resten der Domäne Ib (400-404) und der Domäne III (405-613). Diese Untereinheit agiert als ADP-Ribosyltransferase und verursacht die Inhibition der Proteinbiosynthese,

welche schließlich zur Apoptose der Zielzelle führt¹⁶². Exotoxin A bindet an den Rezeptor CD91 und wird über Rezeptor-vermittelte Endozytose in Clathrin-beschichteten Vertiefungen internalisiert. Im sauren Milieu dissoziiert das Toxin vom Rezeptor und Domäne II wird mithilfe von Furin proteolytisch gespalten. Weiterhin gelangt das C-terminal gespaltene Fragment, welches die enzymatische Untereinheit enthält, über den Golgi-Apparat in das endoplasmatische Retikulum und von hier aus mithilfe der Domäne II in das Zytosol^{163,164}. Hier katalysiert das Enzym die ADP-Ribosylierung des eukaryotischen Elongationsfaktors 2 (EF-2)¹⁶⁵. EF-2 katalysiert normalerweise die GTP-abhängige Translokation der tRNA sowie der mRNA und damit einhergehende Konformationsänderungen innerhalb des Ribosoms¹⁶⁶. Über nukleophile Substitution überträgt die katalytische Untereinheit von Exotoxin A ADP-Ribose auf EF-2, was EF-2 inaktiviert und daraufhin zum Abbruch der Proteinbiosynthese und über Caspase-abhängige Mechanismen schließlich zum Zelltod führt.

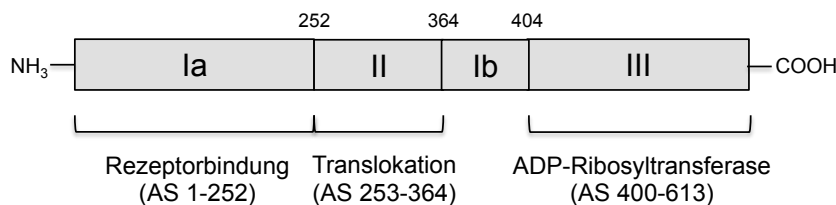


Abbildung 8: Schematische Darstellung von Exotoxin A aus *Pseudomonas aeruginosa* (modifiziert nach Wolf *et al.*¹⁶⁷).

1.3.1 Therapeutische Immuntoxine basierend auf Exotoxin A

Therapeutische Immuntoxine sind chimäre Proteine bestehend aus einer zellbindenden und einer zytotoxischen Domäne. Da die katalytische Untereinheit des bereits beschriebenen Exotoxins A eine hohe toxische Aktivität besitzt, ist es zur Eliminierung von Zellen gut geeignet. Zur Herstellung eines rekombinanten Immuntoxins, werden die natürliche zellbindende Domäne Ia und Teile der Domäne Ib entfernt und durch eine andere antigenspezifische Struktur, meist Antikörperfragmente, ersetzt¹⁶⁸. Durch die Bindung des Antikörperfragments an eine Struktur auf der Oberfläche der Zielzelle, wird das Immuntoxin direkt an den Wirkort geführt und verursacht nach Internalisierung die Apoptose der Zielzelle. ETA-basierte Immuntoxine kamen bisher vor allem bei malignen Erkrankungen zum Einsatz, wobei

die zellbindenden Domänen z. B. spezifisch an CD22, CD25, erbB2 und EpCAM banden¹⁶⁹⁻¹⁷¹. So führte der Einsatz von BL22, einem rekombinanten CD22-spezifischen ETA-basierten Immuntoxin, teils zu einer kompletten Remission bei Patienten mit Haarzell-Leukämie¹⁷². Der erfolgreiche Einsatz rekombinanter Immunttoxine ist generell abhängig von der toxischen Aktivität, der Zugänglichkeit der Zielstruktur und der Wahl des angesteuerten Oberflächenmarkers. Nebenwirkungen treten vor allem auf, wenn das Immuntoxin aufgrund der Wahl der anzusteuernenden Zielstruktur auch an gesundes Gewebe bindet.

Neben der Eliminierung maligner Zellen wurde in präklinischen Studien in Mäusen auch die selektive Eliminierung von B-Zellen erfolgreich durchgeführt¹⁷³. Der Fokus dieser Studien lag vor allem auf der Eliminierung autoreaktiver B-Zellen als mögliche Therapie-Option bei Autoimmunerkrankungen. Nachreiner *et al.* entwickelten daher ein Immuntoxin, das neben ETA die extrazelluläre Domäne des Myelin-Oligodendrozyten-Glykoproteins (MOG) enthält. Bei Patienten mit Multipler Sklerose können auch autoreaktive B-Lymphozyten für die Demyelinisierung verantwortlich sein. Das entwickelte Immuntoxin war in der Lage, den Großteil der MOG-spezifischen B-Zellen zu eliminieren und stellt daher bei Patienten mit Multipler Sklerose eine mögliche Therapieoption dar¹⁷⁴.

1.4 Zielsetzung

Die Entwicklung inhibitorischer Antikörper gegen FVIII ist die schwerwiegendste Komplikation der FVIII-Substitutionstherapie bei Hämophilie A-Patienten, von der bis zu 30 % der Patienten betroffen sind. Die einzige etablierte Standardtherapie besteht in der regelmäßigen Verabreichung hoher FVIII-Mengen, die über bisher nicht aufgeklärte Mechanismen bei 70 % der Inhibitor-Patienten zur Toleranzinduktion führt. Für Patienten, bei denen diese Therapie erfolglos ist, besteht die Gefahr lebensbedrohlicher, unkontrollierbarer Blutungen und erheblicher Gelenkschäden.

Die spezifische Ansteuerung des Membran-gebundenen Immunglobulin G (mIg) des B-Zellrezeptors (BZR) mithilfe von Immuntoxinen stellt eine mögliche Option zur selektiven Eliminierung FVIII-spezifischer Gedächtnis-B-Zellen und somit zur Eradikation von FVIII-Inhibitoren dar. Solche Immunttoxine bestehen aus einer zellbindenden und eine zytotoxischen Domäne, welche nach Internalisierung zur

Apoptose der Zielzelle führt. Da FVIII aufgrund des hohen Molekulargewichts und der potenziellen unspezifischen Bindung an gesundes Gewebe als zellbindende Domäne eher ungeeignet ist, ist das Ziel dieser Arbeit die Entwicklung und Evaluierung von FVIII-Domänen-Immuntoxinen zur selektiven Eliminierung FVIII-spezifischer B-Zellen. Die FVIII-spezifische Immunantwort ist vor allem gegen die C2- und die A2-Domäne gerichtet, weshalb die humane A2- sowie die C2-Domäne (hA2, hC2) an eine verkürzte Version des Exotoxins A aus *P. aeruginosa* genetisch fusioniert werden sollen. Der hier verwendeten Version von Exotoxin A (ETA) fehlt die natürliche zellbindende Domäne, die durch die jeweilige FVIII-Domäne ersetzt wurde. Die resultierenden Immuntoxine hC2-ETA und hA2-ETA sollen bakteriell exprimiert und aufgereinigt und anschließend hinsichtlich der korrekten Faltung und Stabilität charakterisiert werden. Die Eliminierungseffizienz FVIII-spezifischer B-Zellen soll zunächst mithilfe einer Hybridomazelllinie *in vitro* analysiert werden. Im Anschluss soll die Eliminierung FVIII-spezifischer Gedächtnis-B-Zellen sowohl *ex vivo* mithilfe von Splenozyten aus FVIII-immunisierten FVIII^(-/-)-Mäusen als auch *in vivo* in FVIII^(-/-)-Mäusen analysiert werden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung einer neuen Therapieoption für Hämophilie A-Patienten mit Inhibitoren durch die selektive Eliminierung FVIII-spezifischer B-Zellen mithilfe von FVIII-Domänen-Immuntoxinen.

2 Methoden

Alle verwendeten Materialien sind unter 5 beschrieben.

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 DNA-Präparation

Für die Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde das *peqGOLD Plasmid Miniprep Kit 1* nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Präparation größerer Mengen DNA erfolgte mithilfe des *NucleoBond PC500 Plasmid DNA Preparation Kits*. Mithilfe des *peqGOLD Cycle-Pure Kit (Classic-Line)* und des *peqGOLD Gel Extraction Kit* wurden PCR-Produkte bzw. mithilfe von Agarosegelen aufgetrennte DNA-Fragmente präpariert.

2.1.2 DNA-Restriktion

Alle verwendeten Restriktionsenzyme stammten von der Firma NEB und wurden hinsichtlich Puffer und Temperatur nach Angaben des Herstellers verwendet. Im Anschluss an präparative Verdauung von Vektoren wurde 1 µl Alkaline Phosphatase (CIP) für 1 h bei 37°C hinzugegeben, um eine Religation des Vektors zu vermeiden.

2.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten oder PCR-Produkten wurde die horizontale Gelelektrophorese angewandt. 1 % (w/v) Agarose wurde zu TAE-Puffer gegeben und kurz aufgeköcht. Zur Visualisierung der DNA-Fragmente wurde *Roti® GelStain* hinzugegeben. Nach Polymerisierung des Gels wurden die DNA-haltigen Proben mit 6 x *Gel Loading Dye, Blue*, der Firma NEB versetzt und in die Geltaschen aufgetragen. Als Größenstandard diente der *GeneRuler 1kb Ladder™*. Die Auftrennung erfolgte 30 Minuten (min) bei 100 V und wurde mithilfe des *ChemiDocXRS+ Imaging System* und der zugehörigen Software *Image Lab™* analysiert.

2.1.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde zur spezifischen Amplifikation von DNA-Fragmenten angewendet. Für die Reaktion werden neben den *Primern* eine hitzestabile Polymerase,

Desoxynukleotide, Polymerase-Puffer und eine DNA-Vorlage benötigt. Hierzu wurden folgende Komponenten in einem PCR-Gefäß zusammengefügt:

DNA	50 ng
<i>Primer reverse</i> 10 µM	1 µl
<i>Primer forward</i> 10 µM	1 µl
5x HF Puffer	10 µl
2u/µl Phusion® Polymerase	0.5 µl
10 mM dNTPs	1 µl
H ₂ O	ad. 50 µl

Die Komponenten wurden anschließend einer temperaturabhängigen Reaktion in einem *GeneAmp® PCR System 9700* unterzogen. Die *Annealing*-Temperatur (T_a) der verwendeten Primer wurde berechnet durch

$$T_a = \frac{T_{m1} - T_{m2}}{2} - 3^\circ\text{C}$$

T_{m1} und T_{m2} = Schmelztemperaturen der verwendeten Primer

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (min)	
Initiale Denaturierung	98	1	
DNA-Denaturierung	98	0.5	30x
<i>Primer</i> -Anlagerung	T_a	0.5	
DNA-Elongation	72	0.5/kb Amplikon	
	72	10	
Lagerung	4	∞	

Die Analyse der amplifizierten Fragmente erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.1.3).

2.1.4.1 Klonierung der FVIII-Domänen

An die terminalen Basen der hC2-Domäne (Aminosäurereste 2173 bis 2332 in FVIII) sowie der hA2-Domäne (Aminosäurereste 373 bis 740 in FVIII) wurden mit Hilfe der Primer 178/179 (hC2) bzw. 176/177 (hA2) die Schnittstellen *Hind*III und *Xba*I angefügt, sodass die Domänen jeweils in den Vektor pSW220 kloniert werden konnten. Die DNA-Sequenz der hC2-Domäne wurde auch in den Vektor Splgk-HSA mithilfe der Primer 43/56 und den Schnittstellen *Cla*I und *Not*I eingebracht.

2.1.4.2 Site-Directed Mutagenesis

Zur Produktion von ETA im richtigen DNA-Leserahmen wurde ein Adenin (Position 55 im *open reading frame* des Proteins) aus dem Vektor pSW220 mithilfe der Primer 302/303 und dem Q5® *Site-Directed Mutagenesis Kit* nach den Angaben des Herstellers NEB aus der DNA-Sequenz entfernt.

2.1.5 Ligation

Die Ligation von Vektoren und DNA-Fragmenten wurde mithilfe des *Quick Ligation*TM *Kit* von NEB nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Hierzu wurden 50 ng verdauter Vektor mit dem 3-fachen molaren Überschuss der *Insert*-DNA gemischt und zusammen mit dem 2X Quick Ligase Reaktionspuffer, H₂O und der Quick Ligase 5 min bei 25°C inkubiert. Kompetente *E. coli* wurden mit 5 µl des Ligationsansatzes transformiert.

2.1.6 Sequenzierung

300-500 ng DNA wurden mit 2,5 µl *Primer* (10 µM) gemischt und mit H₂O auf ein Volumen von 10 µl gebracht. Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma GATC biotech.

2.1.7 Messung der DNA-Konzentration

Die Messung der DNA-Konzentration erfolgte mithilfe eines NanoDrop 1000 mit zugehöriger Software und nach Angaben des Herstellers.

2.1.8 Arbeiten mit *E. coli*

2.1.8.1 Kultivierung von *E. coli*

Alle Bakterienstämme wurden, wenn nicht anders beschrieben, bei 37°C und 250 rpm kultiviert. Die Bestimmung der optischen Dichte der Bakterienkultur erfolgte mithilfe eines CO8000 Photometers bei 600 nm (OD₆₀₀). Chemisch kompetente *E. coli* des Stammes Origami2™ wurden von der Firma Novagen erworben und in LB_{Lennox/Tet} kultiviert. Elektrokompetente *E. coli* des Stammes ClearColi® wurden von der Firma Lucigen erworben und in LB_{Luria/Miller} kultiviert. Die Inkubation von *E. coli* des Stammes Top10 erfolgte in LB_{Lennox}. Zur Anzucht einer Vorkultur wurden 2-200 ml des jeweiligen Mediums mit den jeweiligen Antibiotika versetzt und eine Kolonie des jeweiligen Bakterienstammes hinzugefügt und über Nacht kultiviert.

2.1.8.2 Lagerung

Durch Zugabe des gleichen Volumens (1:1) an PBS/Glycerin zu Bakterienkulturen konnten alle Bakterienstämme bei -80°C gelagert werden.

2.1.8.3 Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli*

Bakterien des Stammes *E. coli* Top10 wurden über Nacht in 4 ml LB_{Lennox} kultiviert und am nächsten Tag in 200 ml frisches Medium überführt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 kultiviert. Nach 10-minütiger Lagerung auf Eis wurde die Suspension für 10 min bei 3220x g und 4°C zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 20 ml eiskalter CaCl₂-Lösung aufgenommen und 2-4 h auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation wieder für 10 min bei 3220x g und 4°C und die Aufnahme des Pellets in 4 ml CaCl₂/Glycerin-Lösung. Aliquots à 200 µl wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Zur Testung der Kompetenz wurden je 50 µl kompetente Top10 mit verschiedenen Mengen Plasmid-DNA transformiert (siehe 2.1.8.4). Bei mindestens 1 x 10⁶ Kolonien/µg Plasmid-DNA auf der Agarplatte wurden die kompetenten Top10 weiter verwendet.

2.1.8.4 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*

Je 5 µl eines Ligationsansatzes oder 50 ng Plasmid-DNA wurden zu 50 µl chemisch kompetenten *E. coli* Origami2™ oder Top10 gegeben und 5 min auf Eis inkubiert.

Danach erfolgte ein 30 s Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad mit anschließender Zugabe von 250 µl vorgewärmtem SOC-Medium. Die Bakteriensuspension wurde daraufhin bei 37°C und 250 rpm für 1 h inkubiert und anschließend auf antibiotikahaltigen Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

2.1.8.5 Transformation elektrokompeter *E. coli*

Die Transformation der elektrokompenten *E. coli* ClearColi® erfolgte mit 50 ng der Plasmid-DNA und 100 µl elektrokompenten Zellen. Das Gemisch wurde zur Elektroporation in eine Kuvette gegeben und im *Gene Pulser*® bei 200 Ω, 2.5 kV und 25 µF transformiert. Nach der unmittelbaren Zugabe von 1 ml vorgewärmtem antibiotikafreiem Medium wurde das Gemisch 1 h bei 37°C inkubiert. Die Anzucht von Kolonien erfolgte auf einer mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzten Agarplatte bei 37°C über Nacht.

2.1.8.6 Bakterielle Proteinproduktion

Die rekombinanten Proteine hC2-ETA (Plasmid pSW220-hC2), hA2-ETA (pSW220-hA2) und ETA (pSW220-Kontrolle) wurden in *E. coli* produziert. Hierzu wurde eine 250 ml Vorkultur des jeweiligen Plasmid-haltigen Bakterienstammes (Origami2™ oder ClearColi®) über Nacht kultiviert und am nächsten Tag 2-6 l des jeweiligen Mediums 1:30 mit der Vorkultur versetzt. Die Kultivierung der Bakteriensuspension erfolgte bei 37°C und 250 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0.6. Anschließend wurde durch Zugabe von 0.25 mM IPTG (Endkonzentration) die bakterielle zytoplasmatische Produktion des jeweiligen Proteins für 5 h bei 30°C und 250 rpm induziert. Nach der angegebenen Zeit wurde die Bakteriensuspension bei 6000x g für 30 min und 4°C abzentrifugiert. Falls die Präparation der Proteine aus den Bakterien nicht sofort erfolgte, wurden die Bakterienpellets bis zu 24 h bei -80°C gelagert.

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Zellzählung

Alle Zellen wurden mithilfe einer Neubauer-Zählkammer (C-Chip) gezählt. Hierzu wurden die Zellen 1:10 mit 0,1%-Trypanblaulösung versetzt und 10 µl der

Suspension in die Zählkammer gegeben. Nach Zählung der lebenden Zellen innerhalb von vier Quadraten unter dem Lichtmikroskop ergibt sich die Zellzahl pro ml durch folgende Gleichung:

$$\text{Zellzahl / ml} = \frac{\text{Lebendzellen}}{4} \times 10 \times 10000$$

2.2.2 Kultivierung eukaryotischer Zelllinien

Alle Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Zelllinien wurden in Abständen von zwei bis sieben Tagen geteilt und je nach Teilungsrate regelmäßig in neue Zellkulturflaschen überführt (passagiert). Zur Lagerung wurden Zellpellets aus 5 x 10⁶ Zellen in jeweils 1 ml DMSO/FBS aufgenommen und in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.2.1 HEK293T

Diese adhärenzte Zelllinie wurde zur Produktion rekombinanter Proteine genutzt. Die Kultivierung erfolgte in DMEM_{comp} Medium. Zur Teilung der Zellen wurde Trypsin-EDTA hinzugefügt. Durch Zugabe von frischem DMEM_{comp} wurde die Trypsinierungsreaktion gestoppt.

2.2.2.2 BO2C11- und LE2E9-Hybridomas

Die humanen Hybridoma-Zelllinien sekretieren jeweils den FVIII-Inhibitor BO2C11 oder LE2E9. Die Kultivierung der B-Suspensionszellen erfolgte in DMEM/F12_{comp}.

2.2.2.3 Raji

Die humane Burkitt-Lymphom-Zelllinie wurde in RPMI_{comp} kultiviert.

2.2.3 Transiente Transfektion von HEK293T

Zur rekombinanten Produktion von Proteinen wurden je 5 x 10⁶ Zellen/ml in DMEM_{comp} in 10 cm-Zellkulturschalen ausgesät und 24 h inkubiert. Anschließend wurden pro Platte je 5 µg zu transfizierende DNA mit 40 µl PEI und 1 ml DMEM_{-FBS} gemischt, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und tropfenweise auf die Zellen gegeben. Nach weiteren 24 h Inkubation erfolgte ein Mediumwechsel von DMEM_{comp} zu DMEM_{ITS}. Die Zellkulturüberstände wurden nach weiteren 24 h, 48 h und 72 h

gesammelt, für 10 min bei 400x g zentrifugiert und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.4 MTT-Test zur Bestimmung der Lebendzellzahl

Für die Bestimmung der Lebendzellzahl von BO2C11-Hybridomas nach Inkubation mit verschiedenen Proteinen wurde DMEM/F12_{Phenol} verwendet. Je 80 µl einer 1.5×10^6 Zellen/ml Suspensionslösung wurden pro well in eine 96-well Zellkulturplatte gegeben. Nach Zugabe der Toxine in verschiedenen Konzentrationen in einem Volumen von 20 µl wurden die Zellen 20 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde die Platte für 5 min bei 600x g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen in 80 µl DMEM/F12_{Phenol} gelöst. Daraufhin erfolgte die erneute Zugabe der Toxine in der jeweils selben Konzentration in einem Volumen von 20 µl. Nach weiteren 20 h Inkubation wurden je 80 µl MTT-Arbeitslösung pro well für 5 h hinzugegeben. Die anschließende Lösung der gebildeten unlöslichen Formazan-Kristalle erfolgte durch Zugabe der HCl/SDS-Lösung für 1 h. Alle Inkubationsschritte wurden bei 37°C und 5% CO₂ durchgeführt. Der Umsatz von MTT zu Formazan in lebenden Zellen wurde durch Messung der Absorption bei 570 nm (620 nm Referenz) mithilfe des Tecan SunriseTM quantifiziert. Um den Zusammenhang zwischen Absorption und Zellzahl feststellen zu können, wurde eine 1:2 Verdünnungsreihe der BO2C11-Hybridomas von 2×10^6 bis 1.8×10^3 Zellen/ml erstellt und diese derselben Behandlung unterzogen.

2.2.5 Durchflusszytometrische Analyse von BO2C11-Hybridomas

2×10^5 Zellen der Zelllinie BO2C11 wurden der Suspension entnommen und zweimal gewaschen. Alle Färbe- und Waschschrte wurden in 50 µl beziehungsweise 500 µl PBS + 2 % FBS durchgeführt, wobei alle Färbeschrte im Dunkeln durchgeführt wurden. Die Zellen wurden mit 1:50 verdünntem Maus-anti-CD79a-Antikörper und 12 pmol biotinylierten HSA-hC2 für 20 min bei 4°C gefärbt. Nach dreimaligem Waschen der Zellen wurden sie schließlich mit je 1:50 Streptavidin-Allophycocyanin (APC), Phycoerythrin (PE)-gekoppelten anti-Maus-Antikörper und Viabilitätsfarbstoff bei 4°C für 20 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden die Zellen in einem Volumen von 300 µl PBS + 2 % FBS aufgenommen und die durchflusszytometrische

Analyse an einem BD FACSCanto 10 durchgeführt, wobei die Auswertung mithilfe der Software FlowJo durchgeführt wurde.

2.2.6 Präparation muriner Splenozyten

Die jeweils aus FVIII^(-/-)-Mäusen unter Narkose entnommene Milz wurde bis zur Präparation der Splenozyten in R10-Medium und auf Eis gelagert (maximal 2 h). Die Milz wurde durch ein 70 µm-Zellsieb gedrückt und die vereinzelt Splenozyten in R10-Medium gesammelt. Nach Zentrifugation für 10 min bei 4°C erfolgte die Aufnahme der Zellen in 1 ml DPBS + 2 % FBS und die anschließende Lyse der Erythrozyten durch Zugabe von 1x BD Pharm LyseTM Puffer nach Angaben des Herstellers für 10 min bei 4°C. Die Zellen wurden nach erneutem Zentrifugieren bei 4°C und 400x g in 8 ml R10-Medium aufgenommen und gezählt (siehe 2.2.1).

2.2.7 Restimulation FVIII-spezifischer B-Zellen

Die frisch präparierten Splenozyten wurden in R10-Medium auf 1.5×10^6 Zellen/ml eingestellt und je 7 ml in eine 6-well-Platte gegeben. Für die Restimulation der FVIII-spezifischen Gedächtnis-B-Zellen wurden 100 ng FVIII/ml Zellsuspension in einem Gesamtvolumen von 100 µl zugegeben. Dies entsprach einer Endkonzentration von 0.04 nM FVIII. Die Ansätze wurden sechs Tage lang bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Restimulation von Gedächtnis-B-Zellen zu Antikörper-sekretierenden Zellen (ASZ) wurde im ELISPOT nachgewiesen (siehe 2.3.14).

2.2.8 Bestimmung Zytotoxizität ex vivo

Um den Einfluss der Proteine auf die Restimulation der Gedächtnis-B-Zellen zu untersuchen, wurden neben der Zugabe von FVIII (siehe 2.2.7) auch die Proteine hC2-ETA, ETA und HSA-hC2 einzeln und in verschiedenen Konzentrationen in einem Volumen von 100 µl/well in R10-Medium zu den Splenozyten gegeben und ebenfalls sechs Tage lang bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Hierzu wurden die Verdünnungsreihen der Proteine so hergestellt, dass die Endkonzentration des jeweiligen Proteins/well 4, 0.4, 0.04 oder 0.004 nM betrug. Der Nachweis der Restimulation von Gedächtnis-B-Zellen zu ASZ erfolgte im ELISPOT (siehe 2.3.14).

2.3 Proteinchemische Arbeitsmethoden

2.3.1 Lagerung von Proteinen

Alle Proteine wurden für Lagerungen unter 5 h auf Eis gelagert. Für die längerfristige Lagerung bei -80°C wurden sie in 10-50 µl Aliquots aufgeteilt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

2.3.2 Präparation rekombinant exprimierter Proteine

2.3.2.1 *E. coli*

Bakterienpellets (siehe 2.1.8.6) wurden durch Zugabe von 10-50 ml Lysepuffer und vorsichtiger Resuspension gelöst. Der Aufschluss der Zellen erfolgte durch Sonifizierung für 2 min bei 30 % Aktivität mit je 10 s Puls und 10 s Pause. Die Zellen wurden hierfür durchgehend auf Eis gehalten. Im Anschluss wurde die Suspension bei 10.000x g für 45 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand für die weitere Verarbeitung sterilfiltriert (Porengröße 0.22 µm). Die Reinigung der rekombinanten Proteine erfolgte mittels IMAC durch einen N-terminalen und integralen His6x-tag (siehe 2.3.3).

2.3.2.2 HEK293T

Die bei -80°C gelagerten Zellkulturüberstände (siehe 2.2.3) wurden im Wasserbad aufgetaut und mithilfe eines NALGEN-Flaschenaufsatzes und Cellulose-Acetat-Filters sterilfiltriert (0.22 µm). Anschließend wurden sie 1:9 mit 10x HisA-Puffer versetzt und 1 h auf Eis inkubiert, bevor sie ein zweites Mal sterilfiltriert wurden. Die Reinigung der exprimierten Proteine erfolgte mittels IMAC durch einen N-terminalen His10x-tag (siehe 2.3.3).

2.3.3 Aufreinigung rekombinanter Proteine mittels *Immobilized Metal Ion Chromatography* (IMAC)

Eine 1 ml HisTrap HP-Säule wurde zunächst mit H₂O gewaschen und anschließend mit 10 ml Waschpuffer äquilibriert. Die in Lysepuffer vorliegenden bakteriellen Proteine und die mit 10x HisA-Puffer versetzten Zellkulturüberstände wurden jeweils über eine REGLO Digital Peristaltikpumpe auf eine HisTrap HP-Säule geladen und diese anschließend mit 10 ml Waschpuffer gewaschen. Alle bisherigen Schritte

wurden in einer Kühlkammer durchgeführt. Die Reinigung der rekombinanten Proteine erfolgte durch graduelle Elution mithilfe eines ÄktaPrime-Systems. Das Programm ist in Tabelle 2 dargestellt:

Tabelle 2: IMAC-Programm des ÄktaPrime-Systems mit gradieller Elution

Schritt	Volumen	Konzentration Elutionspuffer [%]	Fließ-geschwindigkeit [ml/min]	Fraktionsvolumen [ml]	Ventilposition	Autozero
1	0.0	0	1.0	0	Load	Y
2	20.0	0	1.0	1.0	Load	Y
3	40.0	100	1.0	1.0	Load	N
4	50.0	100	1.0	0.0	Load	N
5	50.1	0	40.0	0.0	Waste	N
6	65.0	0	1.0	0.0	Load	N
7	70.0	0	1.0	0.0	Load	N

Die durch den UV-Detektor ermittelten proteinhaltigen Fraktionen wurden wie jeweils angegeben vereint und einer Dialyse unterzogen.

2.3.4 Dialyse und Konzentration proteinhaltiger Lösungen

Der Pufferwechsel mit zeitgleicher Konzentration proteinhaltiger Lösungen erfolgte durch Anwendung von Vivaspin 20 Konzentratoren (MWCO 10 kDa) nach Angaben des Herstellers. Sollte lediglich ein Pufferwechsel stattfinden, wurde die Proteinlösung gegen mindestens das 1000-fache Volumen des gewünschten Puffers dialysiert. Hierzu wurde die jeweilige proteinhaltige Lösung in einen *Snakeskin*TM Dialyseschlauch (MWCO 10 kDa) gefüllt und die Enden mithilfe von Klammern fest verschlossen. Der gefüllte Schlauch wurde daraufhin in das Gefäß mit dem gewünschten Dialysepuffer gebracht und über Nacht bei 4°C dialysiert. Am nächsten Tag wurde der Dialysepuffer zweimal durch frischen ausgetauscht und 2 h dialysiert. Nach der Dialyse erfolgten in der Regel noch weitere Reinigungsschritte (siehe

2.3.12). Nach Pufferwechsel und Aufkonzentrierung durch Vivaspin 20 Konzentratoren wurden die Proteinlösungen bei -80°C gelagert (siehe 2.3.1).

2.3.5 Messung der Proteinkonzentration

Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte mithilfe eines NanoDrop 1000 mit zugehöriger Software und nach Angaben des Herstellers.

2.3.6 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von denaturierten Proteinen nach ihrer Größe wurde die SDS-PAGE eingesetzt. Die Zusammensetzung des Trenn- und des Sammelgels ist im Folgenden dargestellt:

Bestandteil	Sammelgel (4 %)	Trenngel (12 %)
30 % Acrylamid/Bisacrylamid	0.65 ml	2 ml
Trenngelpuffer	0 ml	1.25 ml
Sammelgelpuffer	1.25 ml	0 ml
10% (w/v) SDS	0.05 ml	0.05 ml
H ₂ O	3.05 ml	1.7 ml

Die Polymerisierung von Acrylamid und Bisacrylamid erfolgte unter Luftausschluss durch Zugabe der Radikalstarter TEMED (5 µl für das Trenngel, 10 µl für das Sammelgel) und APS (je 50µl). Die proteinhaltigen Proben wurden mit reduzierendem Probenauftragspuffer versetzt und 10 min bei 95°C aufgeköcht. Anschließend wurden je 5-15 µl Probe in die Geltaschen aufgetragen. Wurden eukaryotische Zellen als Probe verwendet, wurden diese zuvor 30 min in RIPA-Puffer auf Eis inkubiert und die Zellen anschließend 5 min bei 10000x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit reduzierendem Probenauftragspuffer versetzt und, wie oben beschrieben, weiterbehandelt. Als Größenstandard dienten 3 µl des *PageRuler™ PlusPrestained Protein Ladder*. Die Elektrophorese erfolgte bei 120 V für 90 min in einem mit SDS-Laufpuffer gefüllten *Mini-PROTEAN® tetra cell* System.

2.3.7 Coomassie-Färbung

Um alle Proteinbanden nach einer SDS-PAGE sichtbar zu machen, wurde das jeweilige Polyacrylamid-Gel zunächst 3 x 10 min mit H₂O gewaschen. Daraufhin wurde das Gel in 20 ml *Imperial® Protein Stain* für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Um die unspezifische Hintergrundfärbung zu reduzieren, wurde das Gel im Anschluss 4 x 10 min in H₂O entfärbt.

2.3.8 Westernblot

Der Westernblot diente der Sichtbarmachung bestimmter Proteine, die zuvor über eine SDS-PAGE aufgetrennt wurden (siehe 2.3.6). Im Abschluss an die SDS-PAGE wurde das Sammelgel vom Rest des Polyacrylamid-Gels abgetrennt und das Trenngel luftblasenfrei auf die Trans-Blot® Nitrocellulosemembran aufgelegt. Zu beiden Seiten wurden nun *Whatman*-Filterpapier und *Fiberpads* aufgelegt und alles in richtiger Orientierung in die Kammer des *Mini Trans-Blot® Moduls* geklemmt. Nach Anbringung eines Kühlmoduls wurde die Kammer komplett mit Westernblot-Transferpuffer aufgefüllt. Der Transfer von Proteinen aus dem Polyacrylamidgel auf die Membran erfolgte bei 100 V für 60 min. Im Anschluss wurde die Membran mehrmals mit PBS gewaschen und für 2 h mit 5 % MPBST bei Raumtemperatur geblockt. Zur spezifischen Detektion der Proteine wurde ein HRP-konjugierter anti-FLAG® (M2) Antikörper verwendet. Dieser wurde 1:8000 in 20 ml 5 % MPBST verdünnt und der Blot darin für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde das Gel 6 x 10 min in PBS gewaschen und die spezifisch detektierten Proteinbanden mithilfe des *Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* nach Angaben des Herstellers sichtbar gemacht. Die Auswertung erfolgte mithilfe des ChemiDocXRS+ Imaging Systems und der zugehörigen Software Image Lab™.

2.3.9 Biotinylierung von HSA-hC2

300 µg HSA-hC2 wurden mit 10 mM Sulfo-NHS-LC-Biotin-Lösung in einem Volumen von 500 µl für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Überschüssiges Biotin wurde anschließend mithilfe einer Zeba™ Entsalzungssäule nach Angaben des Herstellers entfernt. In PBS gelöstes biotinyliertes HSA-hC2 wurde bei -20°C gelagert und für durchflusszytometrische Analysen verwendet.

2.3.10 Präparation der schweren und der leichten Kette von FVIII durch Kationenaustauschchromatographie

Für die Trennung der schweren und leichten Kette wurde FVIII bei 4°C gegen EDTA-Puffer dialysiert (MWCO 10 kDa). Die FVIII-haltige Lösung wurde mit einer REGLO Digital Peristaltikpumpe bei 4°C auf eine 1 ml HiTrap SP FF Säule geladen. Die schwere Kette bindet dabei nicht an den Austauscher und befand sich nach Beladung im Durchfluss. Die leichte Kette wurde nach einem Waschschrift mit einem ansteigenden Salzgradienten (100-1000 mM NaCl) in 1 ml Fraktionen eluiert und später mittels SDS-PAGE und Westernblot analysiert (2.3.6, 2.3.8). Alle leichten Kette-enthaltenden Fraktionen wurden vereint und ebenso wie der schwere Kette-enthaltende Durchfluss gegen PBS bei 4°C dialysiert. Die Dialysate wurden aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.3.11 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die Tests wurden in 96-well Mikrotiterplatten durchgeführt. Die Beschichtung der wells erfolgte über Nacht mit 100 µl proteinhaltiger Lösung in PBS bei 4°C. Die Platte wurde nach jedem Inkubationsschritt 3 x mit PBST gewaschen. Um spätere unspezifische Wechselwirkungen zu vermeiden, wurden alle beschichteten wells 2 h mit 5 % MPBST bei Raumtemperatur geblockt. Alle weiteren Inkubationsschritte wurden ebenfalls bei Raumtemperatur und für 2 h durchgeführt. Die Entwicklung erfolgte mit 100 µl o-Phenylendiamin (OPD, aktiviert mit 1:4000 H₂O₂) für 4-12 min und wurde mit 100 µl H₂SO₄ (0.5 M) abgestoppt. Die Absorption innerhalb der wells wurde mithilfe eines Tecan SunriseTM bei 492 nm (Referenz 620 nm) gemessen.

2.3.11.1 Bindung der rekombinant produzierten Proteine an Antikörper

Es wurden je 3.5 pmol rekombinantes Protein (hA2-ETA, hC2-ETA, ETA, HSA-hC2, HSA-hC1, HSA-hA2, HSA) pro well immobilisiert. Anschließend wurden je 0.2 µg Antikörper pro well in einem Volumen von 100 µl PBST hinzugefügt. Tabelle 3 zeigt sowohl die Spezifitäten der verwendeten Antikörper, als auch welcher Antikörper für welches Protein genutzt worden ist.

Tabelle 3: Eigenschaften und Verwendung der eingesetzten Antikörper

Antikörper	Spezifität	verwendet für Bindung an
2-117 (GMA-8003)	hC2	hC2-ETA, HSA-hC2
2-77 (GMA-8006)	hC2	hC2-ETA, HSA-hC2, hA2-ETA (Kontrolle), ETA (Kontrolle)
3G6 (GMA-8014)	hC2	hC2-ETA, HSA-hC2
1B5 GMA-8008)	hC2	hC2-ETA, HSA-hC2
ESH8	hC2	hC2-ETA, HSA-hC2
BO2C11	hC2	hC2-ETA, HSA-hC2
1D4 (GMA-8009)	hA2	hA2-ETA, HSA-hA2
GMA-012	hA2	hA2-ETA, HSA-hA2
4A4 (GMA-8015)	hA2	hA2-ETA, HSA-hA2
4F4 (GMA-8017)	hA2	hA2-ETA, HSA-hA2
2-76 (GMA-8021)	hA2	hA2-ETA, HSA-hA2, hC2-ETA (Kontrolle), HSA-hC2 (Kontrolle)
2A9 (GMA-8011)	hC1	HSA-hC1, HSA-hC2 (Kontrolle)
LE2E9	hC1	HSA-hC1
anti-FLAG® M1	FLAG tag (short flag)	HSA-hC2, HSA-hA2, HSA
anti-FLAG® M2	FLAG tag	hC2-ETA, hA2-ETA, ETA
anti-ETA	ETA	ETA

Gebundene Antikörper wurden jeweils mit HRP-konjugierten Sekundärantikörpern nachgewiesen: murine Antikörper mit einem 1:4000 in 5 % MPBST verdünnten Ratte-anti-Maus-Antikörper, humane Antikörper mit einem 1:5000 in 5 % MPBST verdünnten Ziege-anti-human und kanine Antikörper mit einem 1:3000 in 5 % MPBST verdünnten Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper.

2.3.11.2 Domänenspezifität von IgG

1U FVIII oder je 3.5 pmol hC2-ETA, HSA-hC2, HSA-hC1, HSA-hA2, HSA, schwere Kette und leichte Kette wurden immobilisiert. Die aus den immunisierten FVIII^(-/-)-Mäusen gewonnen Plasmen wurden 1:100 in 5 % MPBST verdünnt und nach

Inkubation mit einem 1:4000 in 5 % MPBST verdünnten HRP-konjugierten Ratte-anti-Maus-Antikörper detektiert. Für den Nachweis von Immunkomplexen wurden die Plasmen zuvor 45 min bei 56°C hitzeinaktiviert und anschließend ebenfalls 1:100 in 5 % MPBST verdünnt inkubiert.

2.3.11.3 Stabilität *in vitro*

Um die Stabilität von hC2-ETA und FVIII *in vitro* untersuchen zu können, wurden je 150 pmol/ml sowohl in PBS als auch in Plasma aus naiven FVIII^(-/-)-Mäusen für 0 h, 24 h und 48 h bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden zu unterschiedlichen Zeiten angesetzt, sodass alle zur gleichen Zeit im ELISA getestet werden konnten. Hierzu wurden 0.1 µg anti-C2 Antikörper BO2C11 immobilisiert und die proteinhaltigen Plasmaproben in serieller 1:2 Verdünnung hinzugegeben. Die Detektion der Bindung erfolgte mithilfe des monoklonalen anti-hC2 Antikörpers 2-77. Gebundener 2-77 wurde mithilfe eines HRP-konjugierten Ziege-anti-Maus-Antikörpers nachgewiesen.

2.3.12 LPS-Entfernung aus proteinhaltigen Lösungen

Mithilfe der *PierceTM High-Capacity Endotoxin Removal Spin columns* wurde der LPS-Gehalt bakteriell produzierter Proteine minimiert. Die Anwendung der Säulen erfolgte nach Angaben des Herstellers. Nach jedem Inkubationsschritt erfolgte die Elution durch Zentrifugation bei 500x g für 1 min bei Raumtemperatur. Zunächst wurde die Säule durch Inkubation mit 4 ml 0.2 NaOH in 95 % Ethanol über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Elution wurden 4 ml 2 M NaCl-Lösung auf die Säule gegeben, die im Anschluss direkt wieder eluiert wurden. Nach zweimaligem Waschen der Säule mit H₂O wurde diese 3x mit LPS-Reinigungspuffer äquilibriert. Die jeweilige Proteinlösung wurde nach Dialyse gegen LPS-Reinigungspuffer (siehe 2.3.4) auf die Säule gegeben. Die Inkubation erfolgte für 2 h bei Raumtemperatur rotierend im *MACSMixTM*. Nach Elution der Proteinlösung wurde der LPS-Gehalt bestimmt (siehe 2.3.13). Gegebenenfalls wurde die Lösung einer zweiten LPS-Entfernung unterzogen. Anschließend wurde die Proteinlösung gegen LPS-freies PBS dialysiert und das Protein in Aliquots bei -80°C gelagert (2.3.1).

2.3.13 Bestimmung des LPS-Gehalts

Vor Anwendung rekombinanter Proteine auf eukaryotischen Zellen und in FVIII^(-/-)-Mäusen musste der LPS-Gehalt der Proteinlösungen bestimmt werden. Die Bestimmung des LPS-Gehalts einer Proteinlösung wurde mithilfe des *PierceTM LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit* nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Messung erfolgte in einer 96-well-Platte. Diese wurde zunächst 10 min bei 37°C vorgewärmt. Anschließend wurde die Proteinlösung in verschiedenen Verdünnungen und in einem Volumen von 50 µl auf die Platte gebracht. Um später den LPS-Gehalt bestimmen zu können, wurde eine Standardreihe an LPS-haltigen Lösungen, bestehend aus einem Endotoxin-Standard gemischt mit H₂O, von 1 bis 0.1 EU/ml erstellt und ebenfalls je 50 µl auf die Platte gebracht. Die Platte wurde zunächst weitere 5 min bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden pro well 50 µl des *Limulus Amebocyte* Lysats hinzugegeben und weitere 10 min bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 100 µl chromogenem Substrat mit weiteren 6 min Inkubation bei 37°C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl 25 % Essigsäure gestoppt. Die Absorption bei 405 nm (Referenz 620 nm) wurde mithilfe eines Tecan SunriseTM gemessen. Anhand der Standardkurve und durch lineare Regression konnte der LPS-Gehalt (EU/ml) der Proteinlösungen bestimmt werden.

2.3.14 Enzyme-Linked Immuno Spot Assay (ELISPOT)

Der Nachweis von ASZ erfolgte im ELISPOT auf Polyvinylidendifluorid 96-well *Multiscreen-IP* Filterplatten. Die Platte wurde mit 15 µl 35 % Ethanol aktiviert und anschließend 2x mit 200 µl DPBS gewaschen. Im Anschluss wurden je 2 IU FVIII (Kogenate®) oder 2 pmol hC2-ETA in einem Volumen von 100 µl in DPBS über Nacht bei 4°C immobilisiert. Am nächsten Tag wurde die Platte 4x mit 200 µl DPBS gewaschen und mit 200 µl R10-Medium + 5 % FBS für 2 h bei Raumtemperatur geblockt. Währenddessen wurden die bereits seit 6 Tagen inkubierten Splenozyten jeweils aus den 6-well-Platten entnommen und bei 400x g 10 min zentrifugiert. Die Zellen wurden daraufhin in 1-2 ml frischem R10-Medium aufgenommen und alle Ansätze einzeln gezählt (siehe 2.2.1, 2.2.7, 2.2.8). Nach Blocken der Platte wurden je 200 µl der Zellen auf die Platte aufgetragen und für 5 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Im Anschluss wurden die wells jeweils 4x mit 200 µl DPBS und PBST

gewaschen. Die Detektion der von den ASZ sekretierten Antikörper wurde mit einem in 2 % BSA 1:5000 verdünnten HRP-konjugierten Ziege-anti-Maus-Antikörper nachgewiesen. Die Visualisierung der Bindung erfolgte durch Zugabe einer 1:30 in Acetatpuffer verdünnten AEC-Lösung. Die verdünnte Lösung wurde zunächst sterilfiltriert und 1:2000 mit H₂O₂ aktiviert. Je 100 µl aktivierte AEC-Lösung wurden pro *well* auf die Platte gegeben und die Platte anschließend 10 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss entwickelt. Die Reaktion wurde durch Ausspülen der *wells* mit H₂O gestoppt. Mithilfe eines *ELIScan*® und der zugehörigen Software *EliAnalyse*® wurde die Platte ausgelesen und die *Spots* gezählt.

2.4 Tierexperimentelle Methoden

Alle durchgeführten Tierversuche an den FVIII^{-/-}-Mäusen (B6;129S-F8^{tm1KAZ/J}¹⁷⁵) wurden vom Regierungspräsidium Darmstadt unter der Antragsnummer F 21/05 ("anti-anti-FVIII-Antikörper") genehmigt. Die Tiere wurden in der Zentralen Forschungseinrichtung (ZFE) des Fachbereichs Medizin der Goethe Universität gehalten und gezüchtet. Die Mäuse wurden in genormten Makrolonkäfigen der Größe II in Gruppen von bis zu 5 Tieren gehalten. Neben Einstreu erhielten die Tiere Zellstoff zum Nestbau sowie Futter in Raufen und Tränkflaschen *ad libitum*. Die Aufzucht und Haltung der Tiere, die sich nicht im Versuch befanden, erfolgte in SPF-Barrierhaltung. Für den Zeitraum des Versuchs wurden die benötigten Tiere aus SPF-Haltung ausgeschleust und in anderen, auch für den Nutzer zugänglichen Haltungsräumen untergebracht (individuell ventilierte Käfige, IVC-Haltung).

2.4.1 Blutentnahme und Plasmapräparation

Die Präparation erfolgte entweder aus naiven oder immunisierten FVIII^{-/-}-Mäusen. Um geringe Mengen Blut (< 30 µl) während des Versuchs zu gewinnen, wurde die laterale Schwanzvene der Tiere mithilfe einer 21G 1 x ½"-Nadel punktiert. Um größere Mengen Blut bei Versuchsende zu gewinnen wurde das Tier jeweils anästhesiert (siehe 2.4.2) und nach Öffnung des Brustkorbs das Herz mit einer Spritze (27G x ¾"-Nadel) punktiert. Das gewonnene Blut wurde 1:10 mit Citratlösung versetzt und 15 min bei 1500x g zentrifugiert. Das aus dem Überstand gewonnene Plasma wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C in Aliquots von 10 bis 20 µl gelagert.

2.4.2 Anästhesie

Die Mäuse wurden durch Injektion von 100 mg/kg Ketamin und 10 mg/kg Xylazin anästhesiert. Angesetzt wurde die Lösung in physiologischer Kochsalzlösung mit 16,7 mg/ml Ketamin und 1,7 mg/ml Xylazin. Die Injektion erfolgte intraperitoneal durch eine Spritze mit einer 30G x ½"-Nadel. Hierbei wurden mehrmals kleine Mengen bis zum Ausbleiben des Zwischenzehenreflexes injiziert.

2.4.3 FVIII-Immunisierung und Milzentnahme

Zur Bildung von anti-FVIII-Antikörpern erfolgte die wöchentliche intravenöse Immunisierung der Tiere mit je 2 IU FVIII (Kogenate®) in 200 µl DPBS durch eine Spritze mit einer 30G x ½"-Nadel für vier Wochen. Eine Woche nach der letzten Injektion erfolgte die Abnahme kleiner Mengen Blut (2.4.1) und die Überprüfung der Präsenz von anti-FVIII-Antikörpern im ELISA (2.3.11.2). Für den *ex vivo*-Zytotoxizitätsassay wurde die Milz direkt entnommen (2.2.6, 2.2.7). Alle anderen Tiere wurden weiteren Injektionen unterzogen (2.4.4).

2.4.4 Injektion der Immuntoxine und Kontrollen

Der Einfluss der Proteine hC2-ETA und ETA auf hC2-spezifische B-Zellen wurde auch *in vivo* untersucht. Hierzu erfolgte die Injektion von 164 pmol hC2-ETA (10 µg) oder ETA (6.5 µg) in jeweils 200 µl DPBS oder 200 µl DPBS alleine in je ein Versuchstier an zwei aufeinanderfolgenden Tagen durch eine Spritze mit einer 30G x ½"-Nadel. Einen Tag nach der letzten Injektion wurde das Tier anästhesiert und Blut sowie Milz entnommen (siehe 2.4.2, 2.4.3). Mit den Milzzellen wurde wie in 2.2.6 und 2.2.7 beschrieben weiter verfahren.

2.5 Grafische und Statistische Auswertung

Für die Auswertung und grafische Darstellung der durchflusszytometrischen Analyse wurde die Software FlowJo verwendet. Alle weiteren grafischen Darstellungen, Regressionen und statistischen Auswertungen wurden mithilfe von GraphPad Prism® generiert. Für die Auswertung der UV-Detektionskurven aus der Software UNICORN PrimeView 5.0 wurden die einzelnen Datenpunkte in GraphPad Prism® übertragen und graphisch dargestellt. Alle anderen Datenpunkte wurden entweder in Duplikaten oder Triplikaten generiert und sind als Mittelwert ± Standardabweichung

(SD) dargestellt. Für die Signifikanzanalysen wurde jeweils ein *One-Way ANOVA* und *Tukey's multiple comparisons* Test verwendet, wobei eine Normalverteilung der Datenpunkte angenommen wurde.

3 Ergebnisse

3.1 Produktion und Charakterisierung der Immuntoxine und Kontrollen

Die Immuntoxine hA2-ETA und hC2-ETA wurden jeweils bakteriell exprimiert. Um später unspezifische Effekte des Toxins untersuchen zu können, wurde auch ETA ohne jegliche zellbindende Domäne hergestellt. Weiterhin wurde ein zusätzliches Kontrollprotein, bestehend aus der hC2-Domäne, in Fusion mit humanem Serum Albumin in HEK293T-Zellen produziert (HSA-hC2). Durch die Fusion der hC2-Domäne an HSA ließ sich Ausbeute des rekombinanten Proteins erheblich erhöhen¹⁰⁴. Alle rekombinant produzierten Proteine enthielten mindestens einen His-tag und konnten daher über eine Metall-Chelat-Affinitätschromatographie (IMAC) aufgereinigt werden (Abbildung 9).

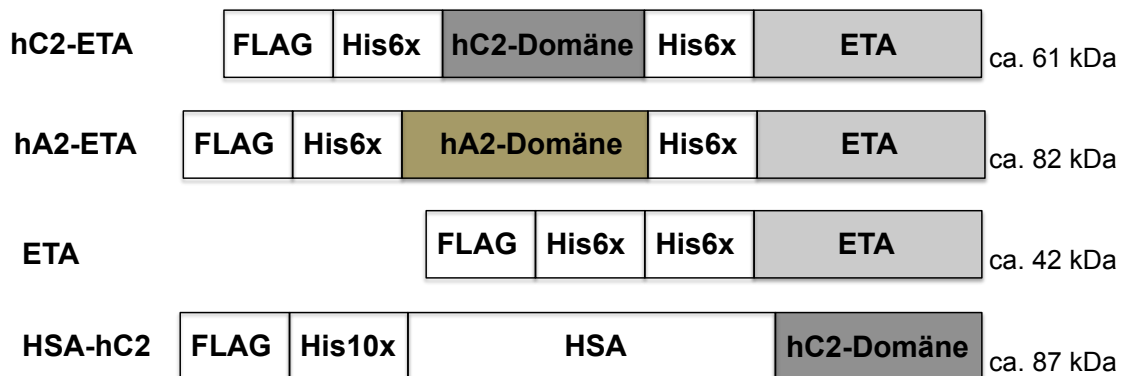


Abbildung 9: Schematische Darstellung der rekombinant hergestellten Proteine. hA2-ETA, hC2-ETA und die Kontrolle ETA wurden bakteriell produziert, wohingegen die Kontrolle HSA-hC2 in humanen HEK293T-Zellen hergestellt wurde. Über die His-tags erfolgte die Präparation mittels IMAC aus dem Bakterienlysat bzw. dem Zellkulturüberstand. Der N-terminale FLAG-tag diente zum Nachweis im ELISA und im Westernblot.

Die präparierten Proteine wurden im Anschluss mittels SDS-PAGE sowohl auf ihre Reinheit und apparentes Molekulargewicht untersucht. Zur Analyse der korrekten Faltung der jeweiligen FVIII-Domäne (hC2, hA2) wurde außerdem die Bindung der Immuntoxine an monoklonale anti-FVIII-Antikörper (mAbs) im ELISA getestet. Im weiteren Verlauf wurden die korrekt exprimierten Immuntoxine von Lipopolysacchariden befreit und auf ihre *in vitro*-Stabilität hin analysiert.

3.1.1 Immuntoxin hC2-ETA

Die DNA-Sequenz der hC2-Domäne (Aminosäurereste 2173 bis 2332 in humanem FVIII) wurde mithilfe der Schnittstellen *HindIII* und *XbaI* in den Vektor pSW220

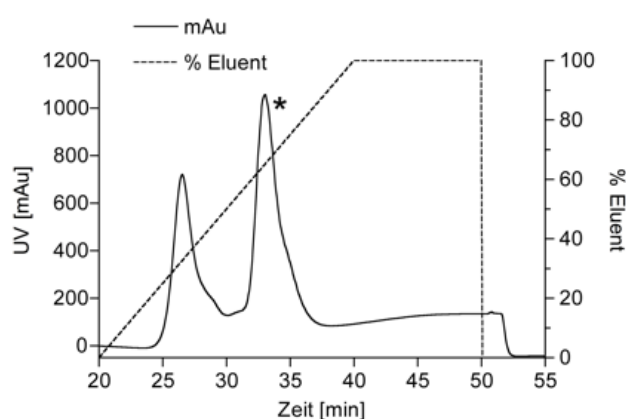
kloniert (pSW220-hC2)¹⁷⁰. Abbildung 10A zeigt die FASTA-Sequenz des offenen Leserahmens (engl. *open reading frame*, ORF) von hC2-ETA, welches in Bakterien des Stammes ClearColi[®] exprimiert wurde. ClearColi[®] ist ein modifizierter BL21-Stamm, der eine für humane Zellen nicht toxische modifizierte Lipopolysaccharidvariante produziert¹⁷⁶. Lipopolysaccharide (LPS) befinden sich normalerweise in der äußeren Membran gram-negativer Bakterien und werden bei Zerfall der Bakterien freigesetzt. Die freigesetzten LPS-Moleküle werden auch als Endotoxine bezeichnet und können in eukaryotischen Zellkulturen unspezifische Effekte hervorrufen, die eine Variabilität der Versuchsergebnisse nach sich ziehen können. Weiterhin führt die Injektion Endotoxin-haltiger Lösungen in Versuchstiere durch Interaktion mit dem Toll-like-Rezeptor 4 und der darauffolgenden Immunaktivierung zu schweren Nebenwirkungen (z. B. septischer Schock)¹⁷⁷. Die Anwendung Endotoxin-haltiger Lösungen ist daher sowohl in Zellkultur als auch *in vivo* in Versuchstieren unbedingt zu vermeiden. Der Endotoxin-Gehalt von hC2-ETA wurde im Anschluss an die Aufreinigung dennoch bestimmt, da ein negativer Einfluss der in ClearColi[®] produzierten LPS-Variante auf murine Zellen nicht ausgeschlossen werden konnte. Die Entfernung von LPS ist hier im Vergleich zu z. B. in BL21 produzierten Proteinen durch den wesentlich niedrigeren LPS-Gehalt erheblich vereinfacht.

Elektrokompetente Bakterien des Stammes ClearColi[®] wurden mit pSW220-hC2 transformiert und verschiedene Einzelklone auf Produktion des vollständigen Fusionsproteins hC2-ETA getestet. Ein Einzelklon wurde ausgewählt und die Proteinproduktion durch Zugabe von IPTG induziert. Die Aufreinigung aus dem Bakterienlysat erfolgte über eine IMAC, wobei hC2-ETA gradiell mithilfe eines ÄktaPrime-Systems von der Säule eluiert wurde (Abbildung 10B). Die proteinhaltigen Fraktionen des zweiten Elutionspeaks (*) wurden vereint, gegen PBS dialysiert und mittels SDS-PAGE und nachfolgender Coomassie-Färbung analysiert (Abbildung 10C). Diese wiesen neben dem vollständigen Immuntoxin einige Abbauprodukte auf, wobei das ca. 62 kDa große hC2-ETA allerdings den Hauptanteil der Lösung ausmachte. Die Ausbeute an hC2-ETA aus 1 l Bakteriensuspension betrug etwa 1,2 mg. Die vereinten Fraktionen des ersten Elutionspeaks wurden ebenfalls analysiert, sie enthielten aber vor allem Abbauprodukte und wurden daher verworfen (Daten nicht gezeigt). Um die korrekte Faltung der hC2-Domäne zu überprüfen, wurde die

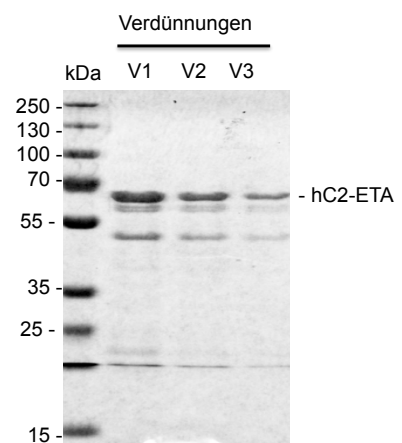
Bindung einiger hC2-spezifischer monoklonaler Antikörper (anti-hC2 mAbs) an hC2-ETA im ELISA getestet (Abbildung 10D). Da die im ELISA verwendeten Antikörper an jeweils unterschiedliche und ausschließlich konformationelle Epitope binden, deutet die Bindung von hC2-ETA an diese mAbs auf die korrekte Faltung der hC2-Domäne hin (siehe 1.2.4)^{111,178-180}. Neben der anti-FLAG-Kontrolle erkannten auch alle anti-hC2 mAbs das rekombinant exprimierte hC2-ETA, wobei gegen die hC1- und die hA2-Domäne gerichteten mAbs keine Bindung an das Immuntoxin aufwiesen (Abbildung 10D). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die hC2-Domäne innerhalb des Immuntoxins korrekt gefaltet vorlag. In einem weiteren Bindungs-ELISA wurde auch die Präsenz der ETA-Domäne mithilfe eines anti-ETA-Antikörpers nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).



B



C



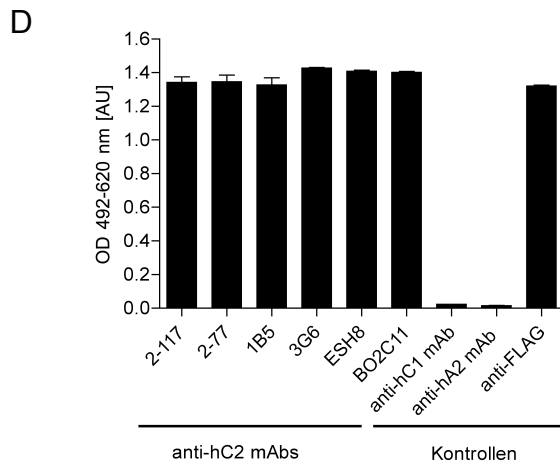


Abbildung 10: Aufreinigung und Charakterisierung von hC2-ETA. (A) FASTA-Sequenz von hC2-ETA. Die DNA-Sequenz der Aminosäurereste 2173-2332 aus FVIII wurden in den Vektor pSW220 kloniert. Der ORF beinhaltet neben hC2 und ETA ebenfalls einen N-terminalen FLAG-tag und zwei integrale His6x-tags. (B) UV-Detektionskurve (mAu) der Elution von hC2-ETA. hC2-ETA wurde von der *HisTrap*-Säule mithilfe eines ansteigenden Imidazolgradienten eluiert (%Eluent). Die Fraktionen der zweiten Elutionskurve (*) wurden vereint und weiter behandelt. (C) SDS-PAGE von hC2-ETA. Je 1.6 µg (V1), 0.8 µg (V2) und 0.4 µg (V3) aufgereinigtes hC2-ETA (ca. 62 kDa) wurden aufgetragen. Proteinhaltige Banden wurden mithilfe einer Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. (D) Bindung von anti-hC2 mAbs an hC2-ETA. Die anti-hC2 mAbs 2-177, 2-77, 1B5, 3G6, ESH8 und BO2C11 wurden in Duplikaten zu immobilisierten hC2-ETA gegeben. Die Detektion der Bindung erfolgte durch einen HRP-konjugierten Ratte-anti-Maus- oder Ziege-anti-human-Antikörper. Als Kontrolle dienen zwei gegen die hC1- bzw. die hA2-Domäne gerichtete mAbs und ein HRP-konjugierter anti-FLAG-Antikörper. Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung (SA) des Mittelwertes von Duplikaten.

Die Bestimmung des Endotoxingehalts in EU (von engl. *endotoxin units*) erfolgte mithilfe eines chromogenen Tests, der sich die Umsetzung von Limulus-Amöbozyten-Lysat durch bakterielle Endotoxine zunutze macht (LAL-Test, siehe 2.3.13). Die Endotoxine wurden im Anschluss an die IMAC-Aufreinigung von hC2-ETA durch die Bindung an den Affinitätsliganden poly(ϵ -Lysin) aus der Lösung entfernt. So konnte der Endotoxingehalt in hC2-ETA von 8138 EU/mg auf 0.94 EU/mg und somit um 99.98 % verringert werden (Daten nicht gezeigt).

Da hC2-ETA im weiteren Verlauf sowohl *in vitro* auf eukaryotischen Zellen als auch *in vivo* in FVIII^(-/-)-Mäusen angewendet werden sollte, wurde im Anschluss die *in vitro*-Stabilität der hC2-Domäne untersucht. Hierfür wurde hC2-ETA sowohl in Plasma von naiven FVIII^(-/-)-Mäusen als auch in PBS inkubiert. Anschließend wurde die Bindung der hC2-Domäne an den anti-hC2 mAb BO2C11 im ELISA überprüft. Der Nachweis der Bindung an BO2C11 erfolgte mithilfe eines anti-FLAG-Antikörpers (Abbildung 11A, B)¹¹¹. Die Stabilität der hC2-Domäne innerhalb von rekombinantem humanem FVIII wurde ebenfalls untersucht (Abbildung 11C). Der Nachweis der Bindung von Plasma-inkubiertem FVIII an BO2C11 wurde mithilfe eines weiteren nicht mit dem Inhibitorparatop interferierenden anti-hC2 mAb (2-77) nachgewiesen. Die Abnahme

des Bindungssignals konnte entweder als Verlust der korrekten Konformation (Denaturierung) oder als Verlust des Moleküls (z. B. durch Proteasen im Plasma) interpretiert werden.

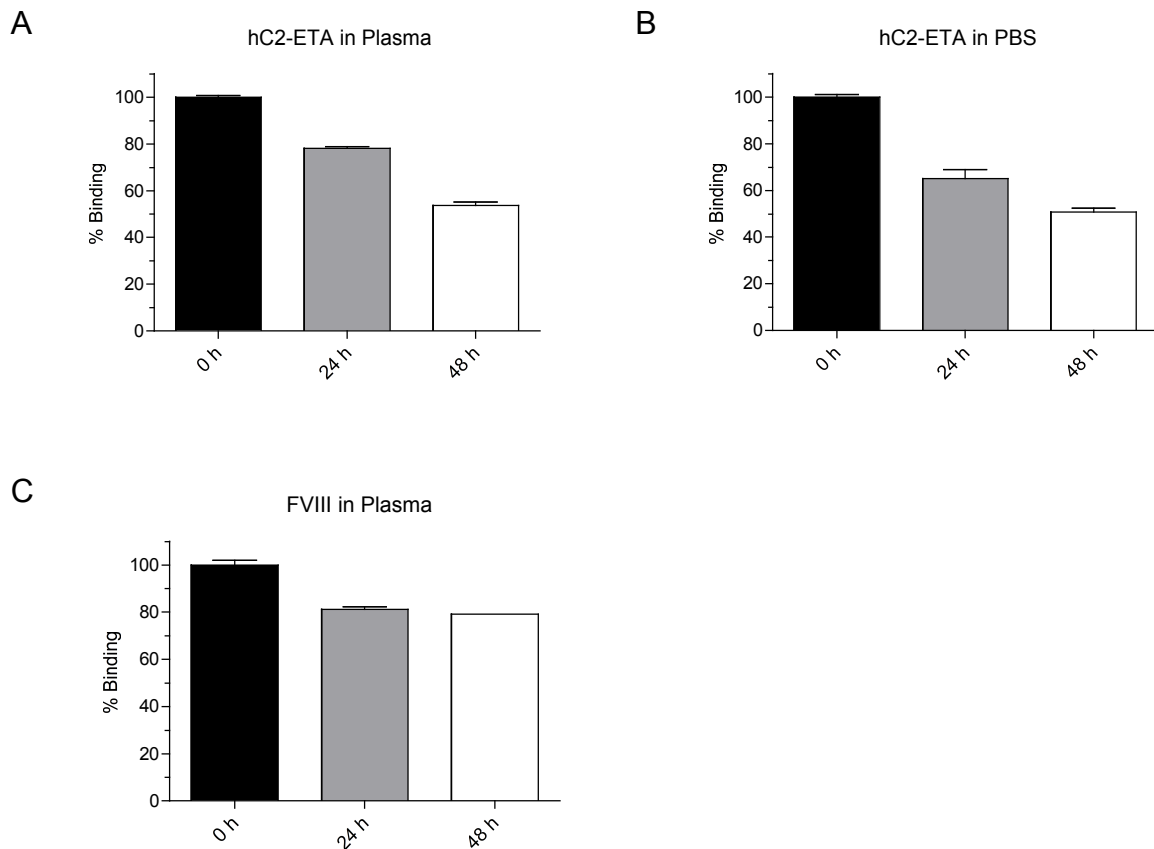


Abbildung 11: Stabilität der hC2-Domäne in hC2-ETA und FVIII. Je (A, B) 10 µg/ml hC2-ETA oder (C) 10 IU/ml FVIII wurden 0, 24 und 48 h in (A, C) Plasma aus naiven FVIII^(-/-)-Mäusen oder (B) PBS bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Bindung an immobilisierten BO2C11 im ELISA gemessen. Die Bindung von hC2-ETA an BO2C11 wurde mithilfe eines anti-FLAG-Antikörpers nachgewiesen. Die Bindung von FVIII an BO2C11 wurde mithilfe des anti-hC2 mAbs 2-77 und einem Ziege-anti-Maus-Antikörpers detektiert. Prozent (%) Bindung bei 24 und 48 h bezieht sich auf die Bindung der Proteine ohne Vorinkubation (0 h = 100 %). Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung (SA) des Mittelwertes von Duplikaten.

Die Inkubation von hC2-ETA bei 37°C führte generell zu einer Abnahme des Bindungssignals. Nach 24 h Inkubation in Plasma sank das Bindungssignal von hC2-ETA auf 78 %, wobei dieser Anteil durch weitere 24 h Inkubation auf 53 % reduziert wurde. Ähnlich verhielt sich hC2-ETA bei Inkubation in PBS. Hier sank der Anteil nach den ersten 24 h auf 65 % und nahm nach einem weiteren Tag Inkubation nochmal um 15 % ab. Die Abnahme des Bindungssignals verhält sich bei Plasma- und PBS-inkubierten hC2-ETA also ähnlich. Dies deutet darauf hin, dass die Abnahme der Bindung auf die Inkubation bei 37°C und somit auf Denaturierung der hC2-Domäne zurückzuführen ist. Die Inkubation von FVIII in Plasma führte ebenfalls

zu einer Abnahme des Bindungssignals. Nach 24 h sank das Bindungssignal auf 80 %, wobei dieses nach weiteren 24 h Inkubation nicht weiter reduziert wurde. Dies zeigt, dass die Konformation der hC2-Domäne bei physiologischen Temperaturen innerhalb von FVIII stabiler ist, als innerhalb des Immuntoxins.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass hC2-ETA mit nativer Faltung der hC2-Domäne in Bakterien des Stammes ClearColi® produziert und anschließend aufgereinigt werden kann. Allerdings ist die Konformation der hC2-Domäne innerhalb von hC2-ETA weniger stabil als die hC2-Domäne innerhalb von FVIII.

3.1.2 Immuntoxin hA2-ETA

Die DNA-Sequenz der FVIII-Aminosäurereste 373 bis 740 wurden analog zu hC2-ETA in den Vektor pSW220 kloniert und so genetisch an ETA fusioniert (siehe 2.1.4.1). Abbildung 12A zeigt die FASTA-Sequenz des ORF von pSW220-hA2. Da die hA2-Domäne zwei intramolekulare Disulfidbrücken (Cys528-Cys554; Cys630-Cys711) besitzt, welche für die Funktion und demnach für die korrekte Faltung notwendig sind, wurde hA2-ETA in gram-negativen Bakterien des Stammes Origami™ 2 produziert¹⁸¹. Origami™ 2 enthält Mutationen sowohl im Gen für die Thioredoxin-Reduktase als auch für die Glutathion-Reduktase. Dadurch ist dieser Bakterienstamm im Gegensatz zu allen anderen Gram-negativen Bakterienstämmen dazu in der Lage, Disulfidbrücken im Zytoplasma auszubilden. Nachdem chemisch kompetente Bakterien des Stammes Origami™ 2 mit pSW220-hA2 transformiert wurden, fand neben der Produktion sowohl die Aufreinigung als auch die weitere Charakterisierung des Immuntoxins analog zu hC2-ETA statt (Abbildung 12B-D). Die Ausbeute aus 1 l Bakteriensuspension betrug hier jedoch nur etwa 150 µg.

Die UV-Detektionskurve der Elution von hA2-ETA wies zwei nicht klar voneinander abzugrenzende Elutionspeaks auf. Da zusätzlich die Signalintensität der UV-Kurve sehr gering war, wurden alle proteinhaltigen Fraktionen in einem Westernblot auf die Anwesenheit von hA2-ETA und Abbauprodukten analysiert (Abbildung 12C). In den Fraktionen 10 und 11 war neben der Bande von hA2-ETA (ca. 82 kDa) noch ein Abbauprodukt zu sehen. Trotzdem wurden aufgrund der geringen Ausbeute alle Fraktionen vereint und gegen PBS dialysiert. Anschließend wurde auch hier die

korrekte Faltung der hA2-Domäne durch Bindung einiger hA2-spezifischer Antikörper (anti-hA2 mAbs) im ELISA überprüft (Abbildung 12 D).

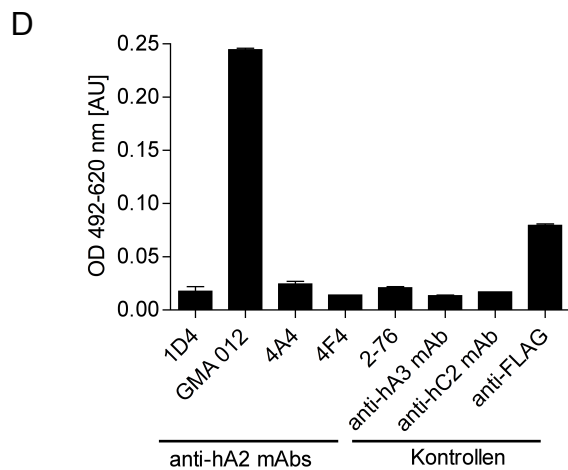
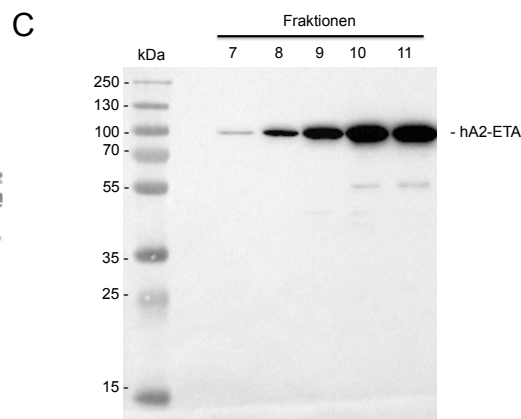
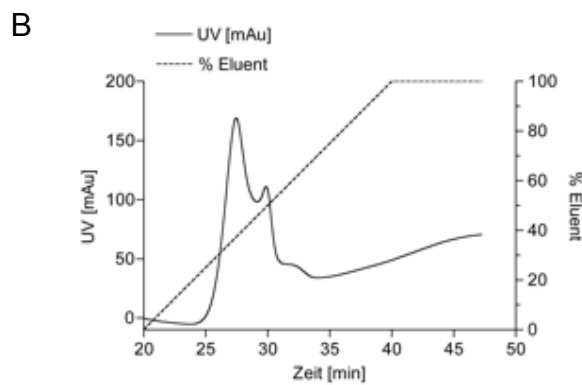


Abbildung 12: Aufreinigung und Charakterisierung von hA2-ETA. (A) FASTA-Sequenz von hA2-ETA. Die DNA-Sequenz der Aminosäurereste 373-740 aus FVIII wurde in den Vektor pSW220 kloniert. Der ORF beinhaltet neben hA2 und ETA ebenfalls einen N-terminalen FLAG-tag und zwei integrale His6x-tags. (B) UV-Detektionskurve (mAu) der Elution von hA2-ETA. hA2-ETA wurde von der *HisTrap*-Säule mithilfe eines ansteigenden Imidazolgradienten eluiert (%Eluent). (C) Westernblot der IMAC-Fractionen 7-11. Je 3 µl der einzelnen Fraktionen wurden aufgetragen und einer SDS-PAGE mit anschließendem Westernblot unterzogen. hA2-ETA wurde mithilfe eines HRP-gekoppelten anti-FLAG-Antikörpers nachgewiesen. (D) Bindung von anti-hA2 mAbs an hA2-ETA. Die anti-hA2 mAbs 1D4, GMA012, 4A4, 4F4 und 2-76 wurden in Duplikaten zu immobilisierten hA2-ETA gegeben. Die Detektion der Bindung erfolgte durch einen HRP-konjugierten Ratte-anti-Maus-Antikörper. Als Kontrolle dienten zwei gegen die hA3- bzw. die hC2-Domäne gerichtete mAbs und ein HRP-konjugierter anti-FLAG-Antikörper. Fehlerbalken kennzeichnen die SA des Mittelwertes von Duplikaten.

Leider wies hier neben der anti-FLAG-Kontrolle lediglich GMA012 eine Bindung an hA2-ETA auf. Da GMA012 ein lineares Epitop erkennt, deutet dies auf eine fehlerhafte Faltung der hA2-Domäne hin.

Das Immuntoxin hA2-ETA konnte folglich nur in geringer Ausbeute löslich in Bakterien des Stammes OrigamiTM 2 produziert und aufgereinigt werden. Zudem wies die hA2-Domäne eine fehlerhafte Faltung auf, weshalb das Protein keinen weiteren Analysen unterzogen wurde.

3.1.3 Kontrolle ETA

Die Selektivität der hier behandelten Immuntoxine soll durch die spezifische Bindung des Immuntoxins an den BZR der jeweiligen Zielzelle gewährleistet sein. Um bei der Analyse der Eliminierungseffizienz solche spezifischen Effekte von unspezifischen Effekten des Toxins unterscheiden zu können, sollte ETA ohne eine zellbindende Domäne hergestellt und aufgereinigt werden. Abbildung 13A zeigt die FASTA-Sequenz des ORF vom Kontrollprotein ETA. Hierfür wurde durch Mutagenese ein Adenin an Position 55 des ORF aus dem Vektor pSW220 deletiert. Die Produktion sowie Aufreinigung und Charakterisierung von ETA wurde ebenfalls analog zu hC2-ETA durchgeführt (Abbildung 13B-D).

Auch hier ergab die Analyse des ersten Elutionspeaks der UV-Detektionskurve mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung, dass diese viele Abbauprodukte enthielt, daher wurden nur die Fraktionen des zweiten Elutionspeaks (*) vereint und weiter analysiert (Abbildung 13B). Die Analyse der vereinten und dialysierten Fraktionen durch die SDS-PAGE und Coomassie-Färbung zeigte, dass auch hier neben ETA Abbauprodukte in der Lösung vorhanden waren (Abbildung 13D). Ähnlich wie bei hC2-ETA, stellte ETA mit ca. 42 kDa ebenfalls den Hauptanteil in der

Proteinlösung dar. Durch Bindung des anti-FLAG- und eines anti-ETA-Antikörpers wurde die Präsenz von ETA in der proteinhaltigen Lösung bestätigt (Abbildung 13C).

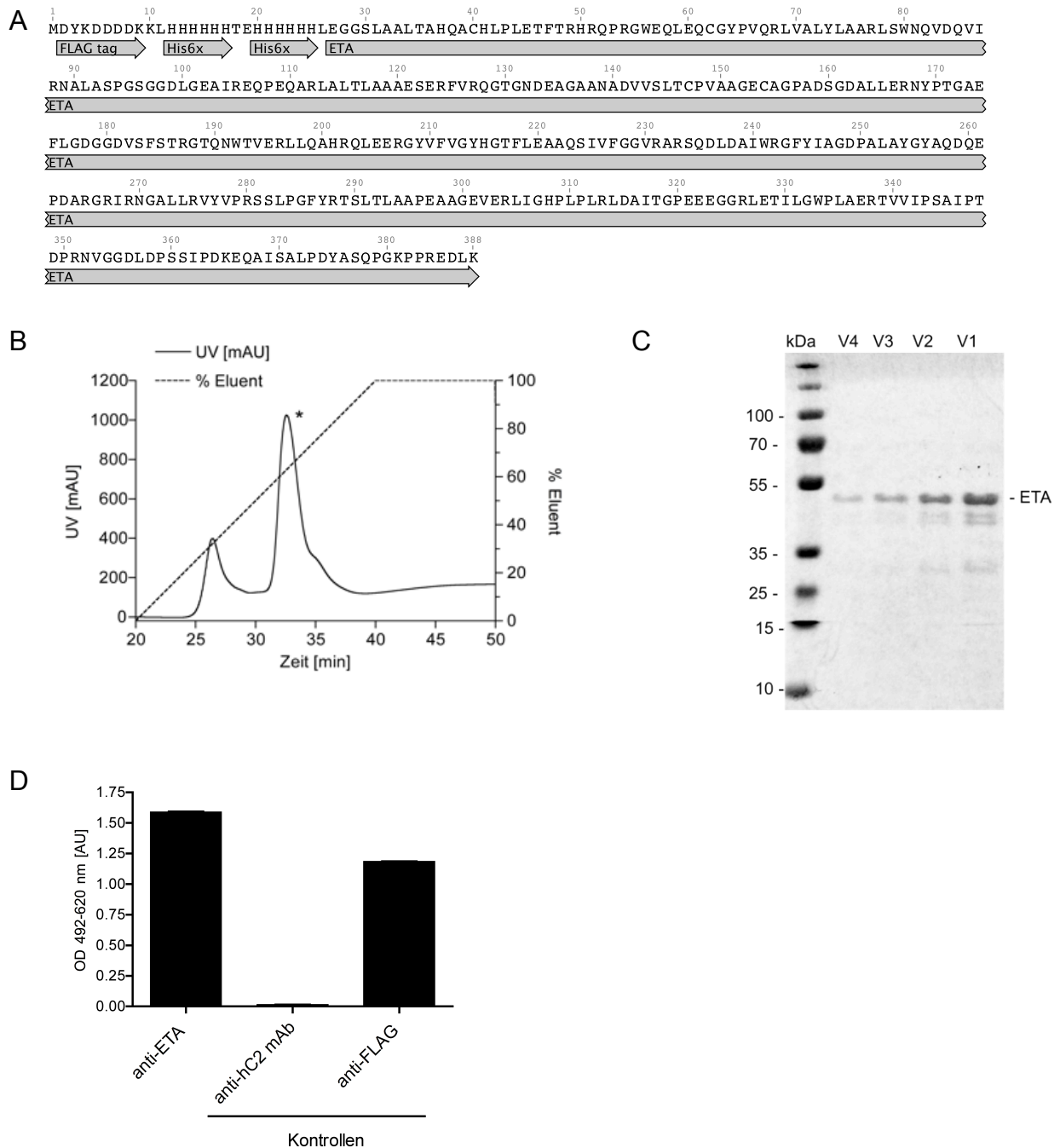


Abbildung 13: Aufreinigung und Charakterisierung von ETA. (A) FASTA-Sequenz von ETA. Ein Adenin an Position 55 wurde aus dem ORF des Vektors pSW220 deletiert. Der ORF beinhaltet neben ETA einen N-terminalen FLAG-tag und zwei His6x-tags. (B) UV-Detektionskurve (mAu) der Elution von ETA. ETA wurde von der HisTrap-Säule mithilfe eines ansteigenden Imidazolgradienten eluiert (%Eluent). (C) SDS-PAGE von ETA. Je 2 µg (V1), 1 µg (V2), 0.5 µg (V3) und 0.25 µg (V4) aufgereinigtes ETA wurden aufgetragen. Proteinhaltige Banden wurden mithilfe einer Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. (D) Bindung an ETA. Ein polyklonaler anti-ETA-Antikörper wurden im Duplikat zu immobilisierten ETA gegeben. Die Detektion der Bindung erfolgte durch einen HRP-konjugierten Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper. Als Kontrolle diente ein anti-hC2 mAb und ein HRP-konjugierter anti-FLAG-Antikörper. Fehlerbalken kennzeichnen die SA des Mittelwertes von Duplikaten.

Für die weitere Anwendung von ETA als Kontrollprotein sowohl auf eukaryotischen Zellen als auch in FVIII^(-/-)-Mäusen wurde der LPS-Gehalt analog wie bei hC2-ETA anschließend von 9163 EU/mg auf 0.88 EU/mg und somit um 99.99 %, reduziert.

3.1.4 Kontrolle HSA-hC2

Um zu untersuchen, inwieweit die bloße Anwesenheit der hC2-Domäne Einfluss auf das jeweilige Versuchsergebnis hat, wurde die hC2-Domäne in Fusion mit humanem Serumalbumin (HSA) in HEK293T-Zellen produziert (HSA-hC2). Durch Fusion der hC2-Domäne an HSA konnte die Ausbeute bei der Proteinproduktion deutlich erhöht werden¹⁰⁴. Mithilfe der Restriktionsschnittstellen *ClaI/NotI* wurde die DNA-Sequenz der hC2-Domäne (Aminosäurereste 2173 bis 2332 in FVIII) in den Vektor Splgk-HSA kloniert, wobei sich im Gegensatz zu hC2-ETA die hC2-Domäne hier am C-Terminus des Proteins befand (Abbildung 14A). Zellen der adhärennten Zelllinie HEK293T wurden mit dem Vektor Splgk-HSA-hC2 transient transfiziert und HSA-hC2 anschließend über eine IMAC aus dem Zellkulturüberstand aufgereinigt. Die Elution des Proteins sowie die anschließende Charakterisierung erfolgte analog zu den oben beschriebenen bakteriell exprimierten Proteinen (Abbildung 14B-D).

HSA-hC2 konnte in HEK293T-Zellen exprimiert und aus dem Zellkulturüberstand aufgereinigt werden (Abbildung 14B-C). Ähnlich wie bei hC2-ETA zeigen die Ergebnisse des Bindungs-ELISAs, dass auch hier die hC2-Domäne korrekt gefaltet vorlag (Abbildung 14C). Die vereinten und gegen PBS dialysierten Fraktionen wurden in einer SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung analysiert. Die proteinhaltige Lösung wies auch hier Abbauprodukte kleineren Molekulargewichts als HSA-hC2 (ca. 82 kDa) auf (Abbildung 14D). Jedoch ist hier ebenfalls zu erkennen, dass HSA-hC2 den Hauptanteil der Proteinlösung ausmacht.

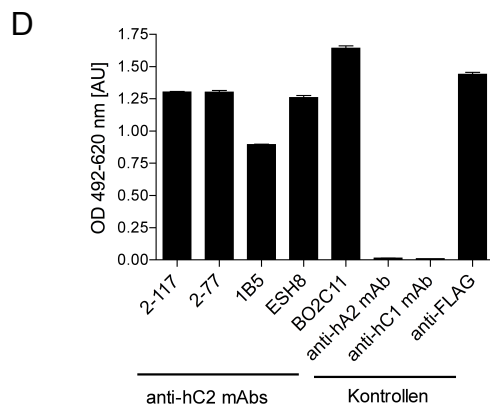
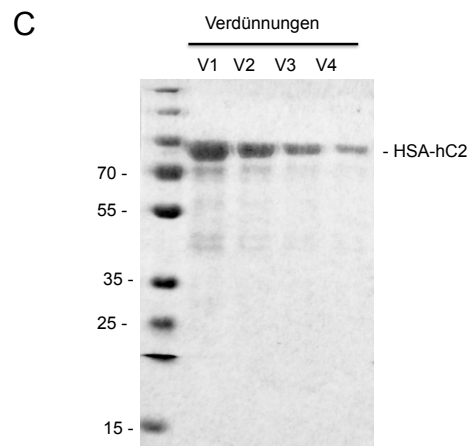
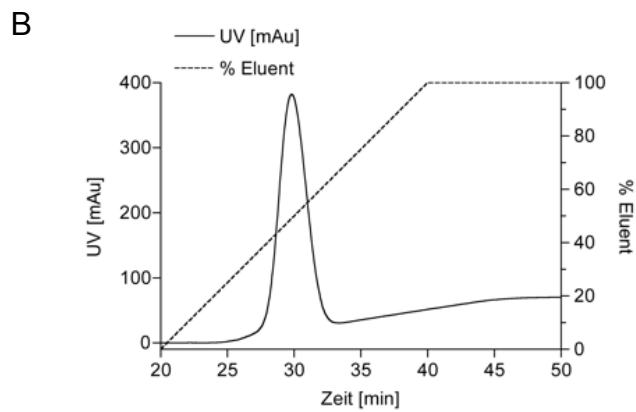
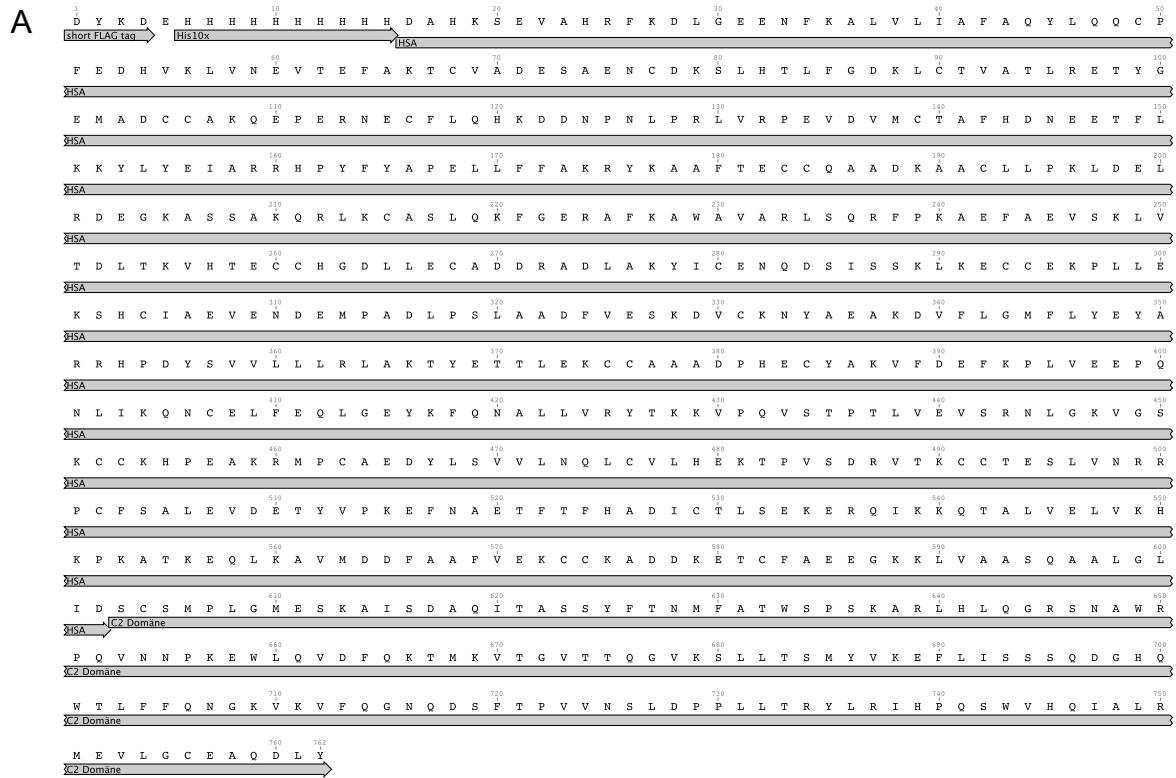


Abbildung 14: Aufreinigung und Charakterisierung von HSA-hC2. (A) FASTA-Sequenz von HSA-hC2. Die DNA-Sequenz der Aminosäurereste 2173-2332 aus FVIII wurden in den Vektor SPIgk-HSA kloniert. Der ORF beinhaltet neben hC2 und HSA einen N-terminalen *short*-FLAG-*tag* und einen N-terminalen His10x-*tag*. (B) UV-Detektionskurve (mAu) der Elution von HSA-hC2. HSA-hC2 wurde von der *HisTrap*-Säule mithilfe eines ansteigenden Imidazolgradienten eluiert (%Eluent). (C) SDS-PAGE von HSA-hC2. Je 2 µg (V1), 1 µg (V2), 0.5 µg (V3) und 0.25 µg (V4) aufgereinigtes HSA-hC2 wurden aufgetragen. Proteinhaltige Banden wurden mithilfe einer Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. (D) Bindung von anti-hC2 mAbs an HSA-hC2. Die anti-hC2 mAbs 2-177, 2-77, 1B5, ESH8 und BO2C11 wurden in Duplikaten zu immobilisierten HSA-hC2 gegeben. Die Detektion der Bindung erfolgte durch einen HRP-konjugierten Ratte-anti-Maus- oder Ziege-anti-human-Antikörper. Als Kontrolle dienten zwei gegen die hA2- bzw. die hC1-Domäne gerichtete mAbs und ein HRP-konjugierter anti-*short*-FLAG Antikörper. Fehlerbalken kennzeichnen die SA des Mittelwertes von Duplikaten.

Obwohl HSA-hC2 in Zellkultur exprimiert wurde, konnte im Anschluss an die Aufreinigung aus dem Zellkulturüberstand ein Endotoxingehalt von 10.16 EU/mg festgestellt werden. Dies lag vermutlich an der Endotoxin-Verunreinigung einiger Puffer. Der Endotoxin-Gehalt wurde daraufhin auf 0.53 EU/mg und somit um 94.79 %, reduziert. HSA-hC2 wurde im weiteren Verlauf als Kontrollprotein auf eukaryotischen Zellen eingesetzt.

3.1.5 Zusammenfassung

Die bisher vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass sowohl hC2-ETA als auch hA2-ETA in gram-negativen Bakterien produziert sowie aus dem Bakterienlysat aufgereinigt werden konnten. Weitere Analysen bezüglich der Faltung der jeweiligen FVIII-Domäne ergaben jedoch, dass in den ETA-Fusionsproteinen lediglich die hC2-Domäne korrekt gefaltet vorlag. Daher war die spezifische Bindung des Immuntoxins hA2-ETA an den BZR der Zielzelle nicht gewährleistet und die Eliminierungseffizienz wurde im Folgenden nicht untersucht.

3.2 Untersuchung der Eliminierungseffizienz von hC2-ETA

hC2-ETA wurde im weiteren Verlauf sowohl *in vitro* auf einer hC2-spezifischen Hybridoma-Zelllinie, *ex vivo* auf FVIII-spezifischen Splenozyten aus FVIII^(-/-)-Mäusen und *in vivo* in FVIII^(-/-)-Mäusen angewendet und damit überprüft, inwieweit das Immuntoxin hC2-ETA in der Lage war, hC2-spezifische B-Zellen zu eliminieren. Als Kontrollen dienten hierbei die ebenfalls erfolgreich produzierten Proteine ETA und HSA-hC2.

3.2.1 Eliminierung der hC2-spezifischen Hybridoma-Zelllinie BO2C11

Zur Analyse der Eliminierungseffizienz von gegen die hC2-Domäne gerichteten B-Zellen *in vitro* wurde die hC2-spezifische Hybridomazelllinie BO2C11 verwendet. Diese Zelllinie wurde durch Immortalisierung mithilfe der Transformation mit dem Epstein-Barr-Virus aus PBMCs eines Inhibitor-Patienten gewonnen¹⁷⁸. Der sekretierte anti-hC2-Antikörper BO2C11 (7000 BU/mg) der Subklasse IgG4 ist hoch-affin (2.5×10^{-11} mol/L) und inhibiert die Bindung von FVIII an vWF sowie an die Phospholipidmembran. Im vorigen Kapitel wurde die spezifische Bindung von BO2C11 an hC2-ETA bereits nachgewiesen (Abbildung 10C). Durch Bindung der hC2-Domäne an den B-Zellrezeptor (BZR) der BO2C11-Hybridomazelllinie soll es zur Internalisierung von hC2-ETA kommen. Die Translokation des zytotoxischen Anteils in das Zytoplasma der Zielzelle sollte anschließend zur Inhibition der Proteinbiosynthese und somit zur Apoptose der Hybridomazelle führen.

BO2C11-Hybridomazellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von hC2-ETA oder ETA inkubiert und die Anzahl an lebenden Zellen anschließend mithilfe des MTT-Tests evaluiert (Abbildung 15A). Der MTT-Test misst die metabolische Aktivität der Zellen durch Umsetzung des Tetrazoliumsalzes MTT zu Formazan, welche im Anschluss durch Messung der Absorption nachgewiesen werden kann. Zusätzlich wurde die Umsetzung von MTT durch unterschiedliche Zellzahlen bestimmt, um die Absorption der Toxin-behandelten Zellen mit einer Zellzahl korrelieren zu können (Abbildung 15B). Die Inkubationszeit betrug 40 h, um dem Immuntoxin ausreichend Zeit zur Bindung und Internalisierung zu geben. Im vorigen Kapitel wurde bereits gezeigt, dass sich die Konformation der hC2-Domäne in hC2-ETA durch Inkubation bei 37°C so verändert, dass das Epitop von BO2C11 verloren geht. Daher wurde den

Zellen nach 20 h Inkubation frisches Medium mit frischem Toxin hinzugesetzt um die Präsenz des korrekt gefalteten Toxins zu gewährleisten.

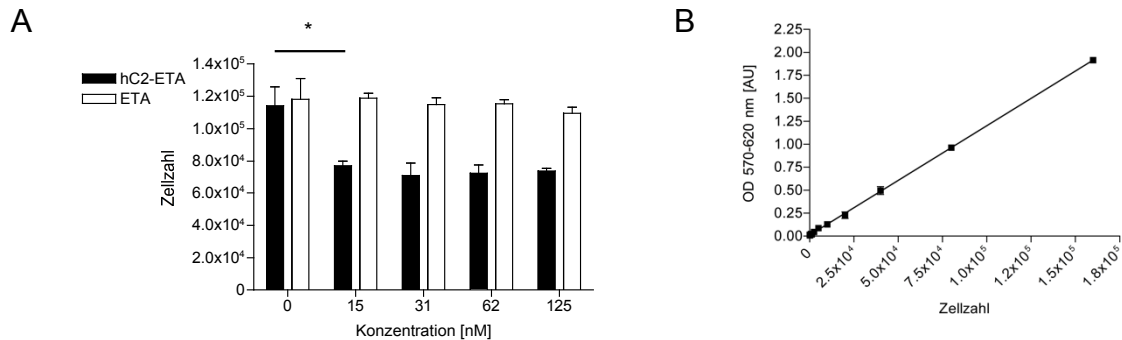


Abbildung 15: Lebendzellzahl von BO2C11-Hybridomas. (A) Zytotoxizität von hC2-ETA und ETA auf BO2C11-Hybridomas. $1,2 \times 10^5$ Zellen wurden 40 h mit Triplikaten unterschiedlicher Konzentrationen des jeweiligen Toxins in einer 96-well-Platte inkubiert. Nach Zugabe von MTT für 5 h wurde die Absorption bei 570 nm gemessen und mit der zugehörigen Zellzahl aus Teil (B) korreliert. Die Signifikanz wurde mittels One-Way-ANOVA-Test analysiert. Ein p-Wert kleiner als 0.05 galt dabei als statistisch signifikant (*, $p < 0.05$) (B) Messung der Absorption unterschiedlicher Zellzahlen nach 5 h Inkubation mit MTT. Unterschiedliche Zellzahlen von BO2C11 wurden in Duplikaten in eine 96-well-Platte gegeben und 5 h mit MTT inkubiert. Die Absorption wurde bei 570 nm gemessen. Fehlerbalken kennzeichnen die SA des Mittelwertes.

Die Inkubation von BO2C11-Hybridomas mit hC2-ETA führte zu einer signifikanten Verringerung der Zellzahl nach 40 h Inkubation. Bereits die Zugabe von 15 nM hC2-ETA reduzierte die Lebendzellzahl von $1,2 \times 10^5$ auf etwa $7,7 \times 10^4$ Zellen. Die Zugabe größerer Mengen hC2-ETA (bis 1 μ M) führte zu keiner weiteren Verringerung der Zellzahl, daher betrug die maximale Reduktion viabler Zellen durch Inkubation mit hC2-ETA nur ca. 40 %. Die Zugabe von ETA bis 125 nM führte zu keiner signifikanten Reduktion der Lebendzellzahl. Dies zeigt, dass reines ETA durch das Fehlen der zellbindenden Domäne nicht internalisiert und daher die toxische Aktivität nicht entfaltet werden konnte. Es blieb allerdings die Frage offen, warum hC2-ETA nur in der Lage war, maximal 40 % der BO2C11-Hybridoma-Zellen zu eliminieren. Daher wurde weiterhin die Expression des BZR in Form der membranständigen Variante von BO2C11 sowie die Anwesenheit des Korezeptors CD79a analysiert¹⁸²(Abbildung 16). Zur Überprüfung wurde das Lysat von je $1,5 \times 10^5$ BO2C11- sowie Rajizellen als Kontrolle mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend in einem Westernblot analysiert. Zur Sichtbarmachung von CD79a wurde ein monoklonaler anti-CD79a-Antikörper aus der Maus verwendet. Mithilfe eines anti-human-Antikörpers wurden sowohl die membrangebundene (HC_M) als auch die sekretierte (HC_S) Form von BO2C11 durch Anfärbung der schweren Kette sichtbar gemacht.

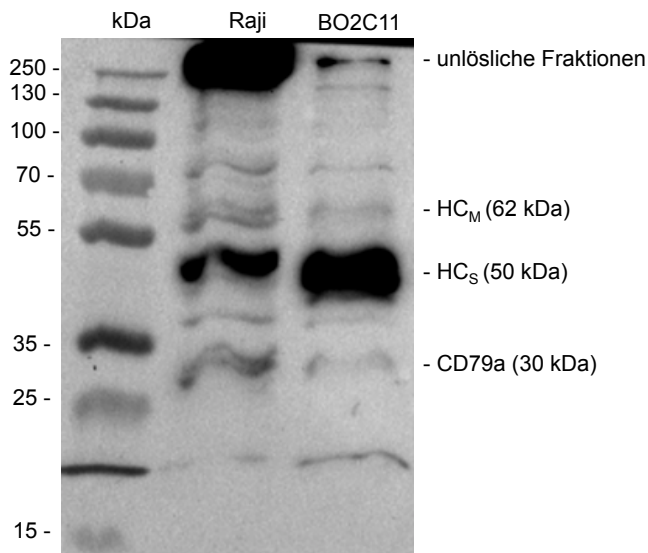
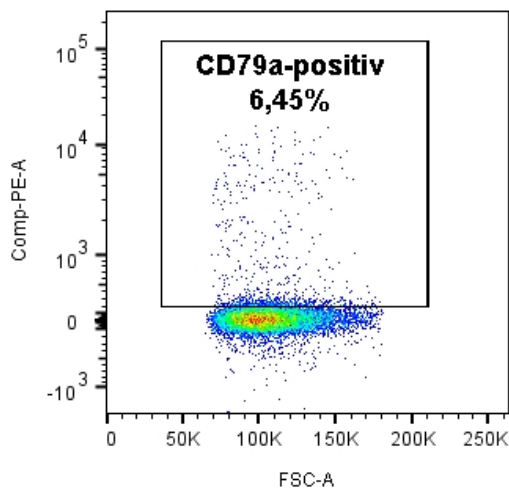


Abbildung 16: Analyse des Zelllysats aus Raji- und BO2C11-Hybridomazellen im Westernblot. Das Lysat von je 1.5×10^5 Zellen wurde aufgetragen und einer SDS-PAGE mit anschließendem Westernblot unterzogen. CD79a wurde mithilfe eines anti-CD79a-Antikörpers und eines HRP-konjugierten anti-Maus-Antikörpers sichtbar gemacht. HC_M und HC_S wurden mithilfe eines HRP-konjugierten anti-human-Antikörpers sichtbar gemacht.

Abbildung 16 zeigt, dass im Zelllysats von Raji- und BO2C11-Zellen neben HC_S sowohl CD79a als auch HC_M vorhanden waren. Die Ergebnisse liefern Grund zur Annahme, dass die Eliminierung von BO2C11-Hybridomas durch Bindung und Internalisierung von hC2-ETA und die dadurch induzierte Apoptose stattgefunden hat. Allerdings erklären sie nicht, warum nur insgesamt ca. 38 % der Zellen eliminiert werden konnten. Mit dem hier gezeigten Westernblot lässt sich der genaue Anteil CD79a-positiver (CD79a⁺) Hybridomazellen nicht ermitteln, dennoch ist erkennbar, dass das Signal für HC_M und CD79a im Verhältnis zu HC_S in BO2C11-Zellen niedriger ausfällt als für die Raji-Zellen. Um quantitativ festzustellen, inwieweit BO2C11-Hybridomas CD79a und BO2C11 auf der Zelloberfläche präsentieren, wurden die Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Hierzu wurden die Zellen wieder mit einem anti-CD79a-Antikörper und außerdem mit biotinyliertem HSA-hC2 angefärbt (Abbildung 17).

A



B

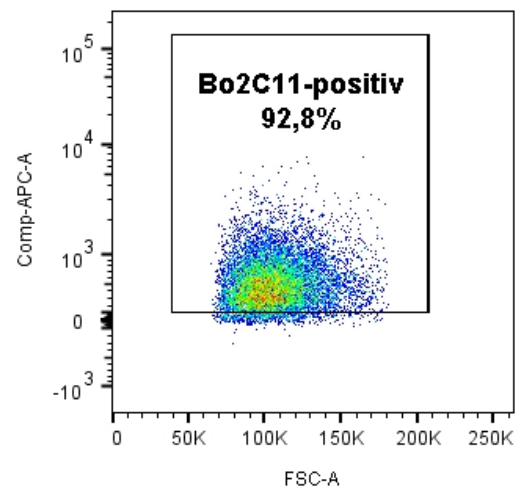


Abbildung 17: Durchflusszytometrische Analyse von BO2C11-Hybridomas. Die Zellen wurden jeweils mit Viabilitätsfarbstoff und verschiedenen Antikörpern behandelt (siehe 2.2.5) und mit unbehandelten Zellen verglichen. Dargestellt sind jeweils die Messungen von 3×10^4 viablen Zellen. (A) Oberflächenpräsentation des BZR-Ko-rezeptors CD79a. BO2C11-Hybridomas wurden mit einem anti-CD79a-Antikörper behandelt und die Bindung anschließend mit einem PE-konjugierten anti-Maus-Antikörper sichtbar gemacht. (B) Oberflächenpräsentation von anti-hC2 IgG BO2C11. Zu den Zellen wurde biotinyliertes HSA-hC2 gegeben und gebundenes Protein durch APC-konjugiertes Streptavidin sichtbar gemacht.

Die quantitative Analyse zeigt, dass nur etwa 6.5 % der Gesamtpopulation CD79a auf der Oberfläche präsentieren. Im Gegenzug binden über 90 % der Zellen HSA-hC2, was darauf hindeutet, dass ein Großteil der Population BO2C11 auf der Oberfläche trägt, wenn auch nicht in Form eines BZR. Eine unspezifische Bindung von HSA-hC2 an BO2C11-Hybridomas konnte durch Überprüfung der Bindung von HSA-hC2 an Rajizellen und eine weitere hC1-spezifische Hybridomazelllinie ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt).

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Hybridomazelllinie hinsichtlich ihrer Oberflächenpräsentation des BZR nicht einheitlich ist, was wiederum eine Ursache für die unvollständige Eliminierung der Zelllinie durch hC2-ETA sein könnte.

3.2.2 Eliminierung hC2-spezifischer B-Zellen *ex vivo*

Die Eliminierungseffizienz von hC2-ETA wurde im weiteren Verlauf an hC2-spezifischen B-Zellen aus FVIII^(-/-)-Mäusen getestet. Diese Mauslinie zeichnet sich durch eine FVIII-Aktivität von unter 1 % im Plasma aus und wurde gentechnisch durch Einfügen einer Neo-Kassette an das 3' Ende von Exon 16 etabliert¹⁷⁵. Durch die Abwesenheit von funktionalem FVIII bilden die Tiere bei regelmäßiger Injektion von humanem FVIII eine FVIII-spezifische Immunantwort in Form von Antikörpern

und zugehörigen Antikörper-sekretierenden Plasmazellen (ASZ) sowie Gedächtnis-B-Zellen aus (Immunisierung)¹⁸³. Gedächtnis-B-Zellen gewährleisten eine beschleunigte und stärkere humorale Immunabwehr bei Neu-Exposition mit dem Antigen. Im Gegensatz zu ASZ besitzen Gedächtnis-B-Zellen einen BZR und können so mit Hilfe des Antigens selektiv angesteuert werden. Da der Anteil an Gedächtnis-B-Zellen im Blut sehr gering (<0.01 bis 0.4 % humaner IgG-positiver B-Zellen) und dadurch in murinen Blutproben nicht messbar ist, wurde für die Untersuchung des Effektes von hC2-ETA auf Gedächtnis-B-Zellen eine etablierte Methode mit Splenozyten verwendet. Hausl *et al.* konnten bereits zeigen, dass FVIII-spezifische Gedächtnis-B-Zellen aus der Milz durch Anwesenheit von FVIII *ex vivo* zu ASZ restimuliert werden können¹⁵⁹. Die Differenzierung von FVIII-spezifischen Gedächtnis-B-Zellen zu ASZ erfordert sowohl die Interaktion mit aktivierten T-Zellen als auch die Stimulierung des BZR durch FVIII. Die neu gebildeten ASZ können im Anschluss anhand der sekretierten Antikörper Antigen-spezifisch im *Enzyme-linked Immunospot Assay* (ELISPOT) nachgewiesen werden. Daher sollten Splenozyten aus FVIII-immunisierten Tieren auch hier als Quelle für FVIII-spezifische Gedächtnis-B-Zellen dienen. Hierzu wurden 2 IU FVIII je einmal wöchentlich für vier Wochen in 8-12 Wochen alte FVIII^(-/-)-Mäuse intravenös (i.v.) injiziert. Die Anwesenheit der Immunantwort in Form von anti-FVIII-Antikörpern wurde 6 Tage nach der letzten Injektion (Tag 27) im ELISA überprüft (Abbildung 18B, 2.3.11.2). Dies war notwendig, da nicht alle immunisierten Tiere eine ausreichend hohe Immunantwort ausbildeten. Zusätzlich hierzu wurde sowohl die Spezifität der Antikörper für die leichte und die schwere Kette als auch die Domänenspezifität für die hA2-, die hC2- und die hC1-Domäne untersucht. Anschließend wurden die Splenozyten aus den Milzen der immunisierten Tiere präpariert und sechs Tage lang in Anwesenheit von 0.04 nM FVIII inkubiert (2.4.3, Abbildung 18A). Die Restimulation von Gedächtnis-B-Zellen zu ASZ wurde daraufhin über deren sekretierte Antikörper im ELISPOT nachgewiesen (2.3.14, Abbildung 18C). Als immobilisierte Antigene dienten hierbei sowohl FVIII als auch hC2-ETA.

Die im Folgenden dargestellten Ergebnisse wurden auch bereits zur Publikation im *Journal of Thrombosis and Hemostasis* eingereichtⁱ.

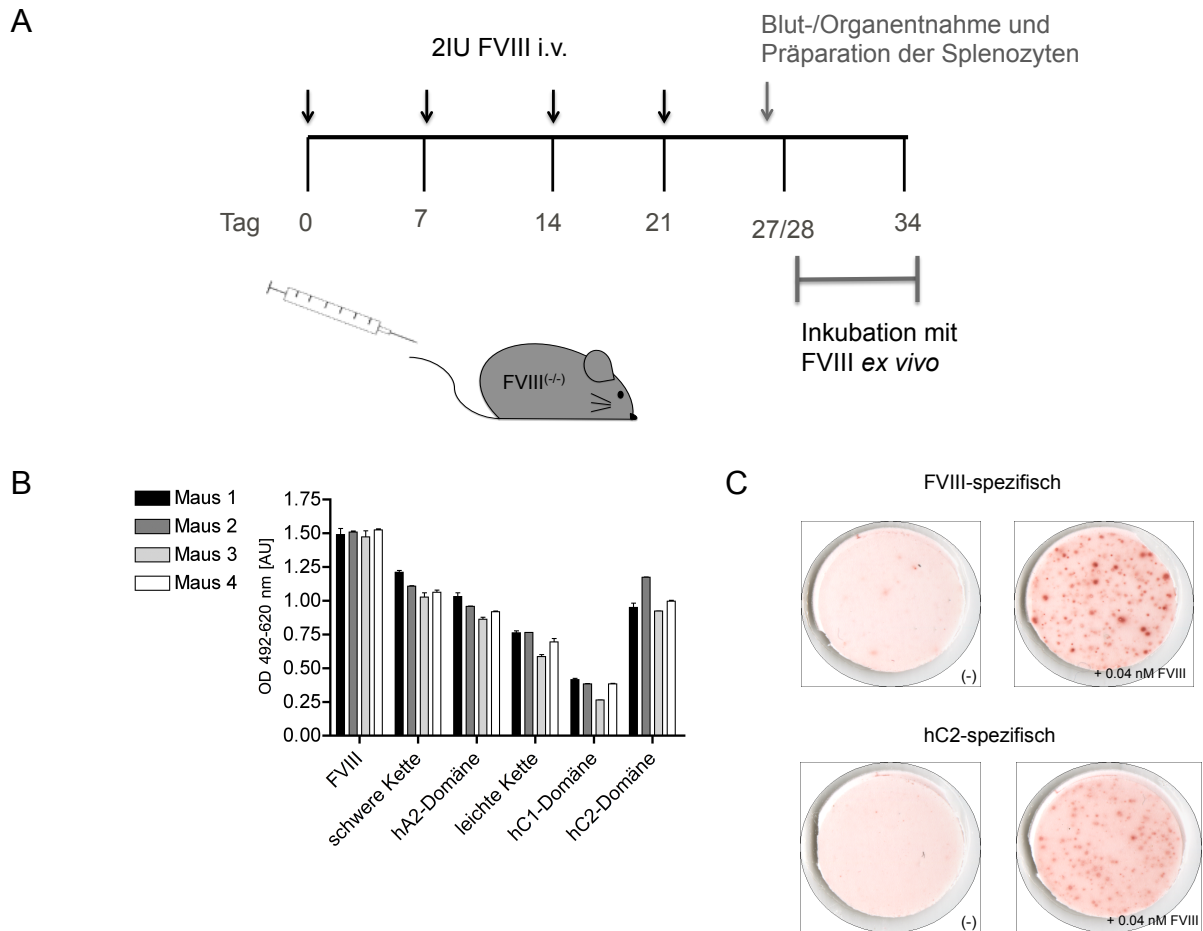


Abbildung 18: FVIII-spezifische Immunantwort in FVIII^(-/-)-Mäusen und Restimulation FVIII-spezifischer Gedächtnis-B-Zellen ex vivo. (A) Vier Wochen lang erhielten 8-12 Wochen alte FVIII^(-/-)-Mäuse wöchentlich je 2 IU hFVIII intravenös in die laterale Schwanzvene. An Tag 27 wurde Blut entnommen und das daraus gewonnene Plasma auf die Präsenz von anti-FVIII-Antikörpern im ELISA getestet. An Tag 28 wurden Antikörperpositive Tiere narkotisiert und die Milz entnommen. Die Splenozyten wurden sechs Tage lang in An- oder Abwesenheit von 0.04 nM FVIII inkubiert. (B) Untersuchung der FVIII-spezifischen Antikörperantwort an Tag 27 im ELISA. Die Diversität der Immunantwort der im Plasma vorhandenen Antikörper aus FVIII-immunisierten FVIII^(-/-)-Mäusen wurde durch Bindung an immobilisierten FVIII, die schwere und leichte Kette von FVIII sowie an die hA2-, hC2- und hC1-Domäne untersucht. Die Detektion der Bindung erfolgte mithilfe eines HRP-konjugierten Ziege-anti-Maus-Antikörpers. Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung (SA) des Mittelwertes von Duplikaten. Das Plasma für die Untersuchung der Immunantwort stammte aus den Mäusen, deren Milzen auch für das in **Abbildung 19** gezeigte Experiment verwendet wurden. (C) Die Restimulation von FVIII-spezifischen Gedächtnis-B-Zellen zu FVIII-spezifischen und hC2-spezifischen ASZ. Die Zellen wurden sechs Tage lang sowohl in Anwesenheit (+ 0.04 nM FVIII) als auch in Abwesenheit (-) von FVIII inkubiert und anschließend zu

ⁱ"Elimination of FVIII-specific B cells by immunotoxins composed of a single FVIII domain fused to Pseudomonas Exotoxin A"; K. Brettschneider[†], A. Schmidt*, J. Kahle*, A. Orłowski*, D. Stichel*, D. Schwabe*, C. Königs*; *Department of Pediatrics and Adolescent Medicine, University Hospital, Goethe University, Frankfurt am Main, Germany; [†]Faculty of Biological Science, Goethe University, Frankfurt am Main, Germany, eingereicht am 12.02.18 im *Journal of Thrombosis and Hemostasis*

immobilisierten FVIII (FVIII-spezifisch) und hC2-ETA (hC2-spezifisch) gegeben. Die Detektion der Bindung, gemessen als Spots, erfolgte mit einem HRP-gekoppelten Ziege-anti-Maus-Antikörper. Hier ist jeweils repräsentativ eine Abbildung der in Doppelbestimmung erfolgten ELISPOT-Analyse gezeigt.

Die regelmäßige Injektion von FVIII in FVIII^(-/-)-Mäuse führte zu einer Immunantwort inklusive der Bildung von FVIII-spezifischen Antikörpern. Die individuellen Immunantworten der Versuchstiere ähnelten sich in der jeweiligen Zusammensetzung hinsichtlich der Binderegionen auf FVIII (Domänen-Spezifitäten). Neben einem großen Anteil an hC2-spezifischen Antikörpern wiesen die Tiere auch Antikörper gegen die hA2- und die hC1-Domäne auf. Durch Inkubation der Splenozyten mit 0.04 nM FVIII konnten nach sechs Tagen FVIII- und hC2-spezifische ASZ durch Detektion sekretierter Antikörper in Form von Spots im ELISPOT detektiert werden. Wurden die Splenozyten ohne FVIII inkubiert, so waren wenige bis keine Spots detektierbar. Dies zeigt, dass *in vivo* gebildete ASZ, die bei Präparation der Splenozyten noch präsent waren, nach sechs Tagen in Kultur gestorben sind und daher zu keiner Verfälschung des Ergebnisses führen können¹⁸⁴.

Um nun die Eliminierungseffizienz von hC2-ETA auf Gedächtnis-B-Zellen aus immunisierten FVIII^(-/-)-Mäusen zu testen, wurden verschiedene Konzentrationen an hC2-ETA von 0.004 nM bis 4 nM zur *ex vivo*-Inkubation mit 0.04 nM FVIII hinzugegeben (Abbildung 19). Die Zellen wurden, wie oben beschrieben, ebenfalls sechs Tage inkubiert. In vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Verwendung von immobilisierten hC2-ETA und HSA-hC2 zur Überprüfung der neu gebildeten ASZ im ELISPOT zu jeweils gleichen Spotanzahlen führt, daher wurde neben FVIII nur hC2-ETA als immobilisiertes Antigen verwendet.

Als Kontrollen während der Kultivierungsphase dienten sowohl HSA-hC2 zur Analyse von hC2-Domänen-Effekten als auch ETA zur Analyse unspezifischer Toxin-Effekte. Eine Abnahme der FVIII- bzw. hC2-spezifischen Spots wurde als Eliminierung von FVIII- bzw. hC2-spezifischen Gedächtnis-B-Zellen gewertet.

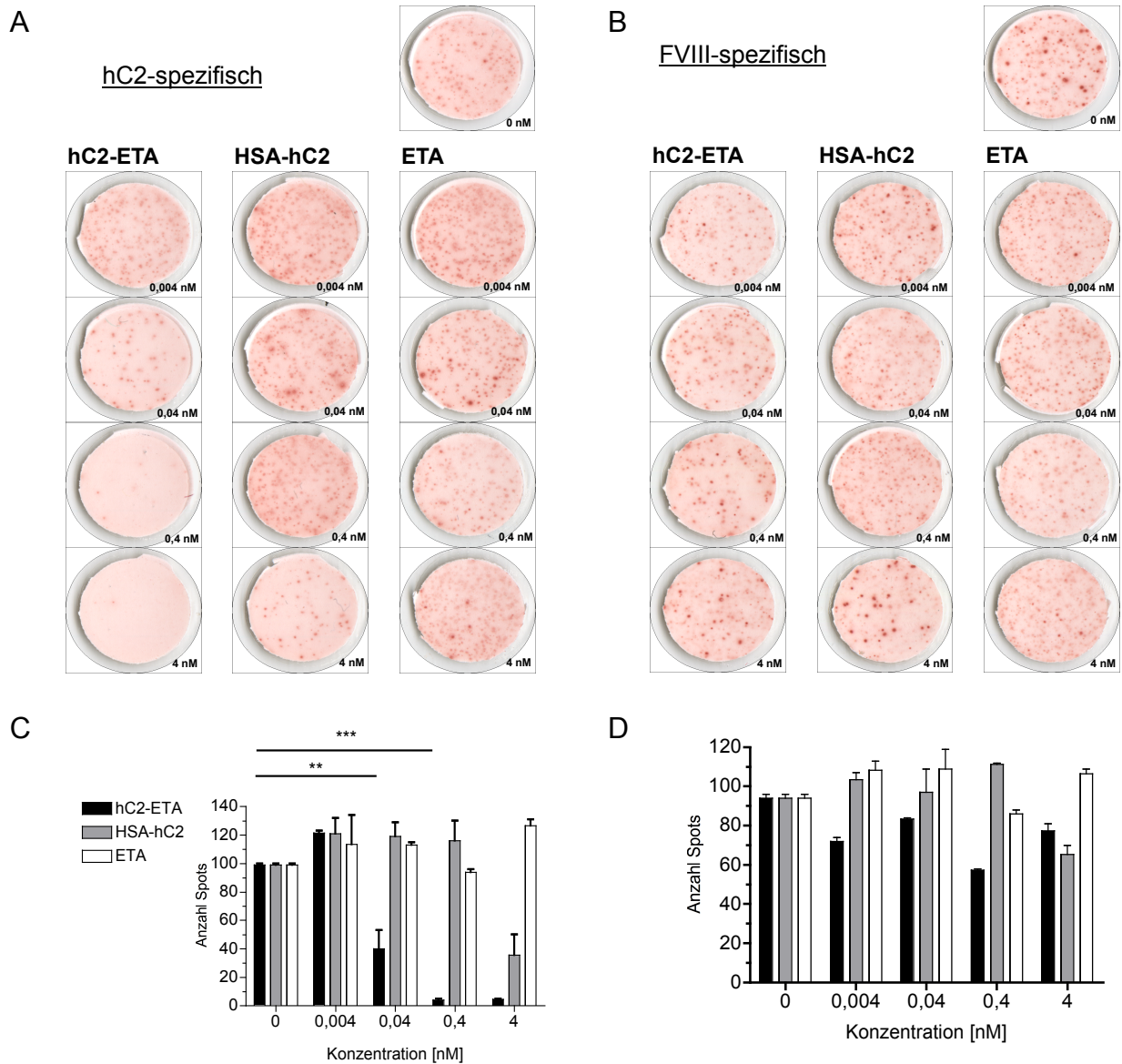


Abbildung 19: Selektive Eliminierung hC2-spezifischer B-Zellen *ex vivo*. Für dieses Experiment wurden Splenozyten aus vier FVIII-immunisierten FVIII^(-/-)-Mäusen vereint und sechs Tage in Anwesenheit von 0.04 nM FVIII und verschiedenen Konzentrationen (0-4 nM) von hC2-ETA, ETA oder HSA-hC2 inkubiert. Die Restimulation von FVIII-spezifischen Gedächtnis-B-Zellen zu ASZ wurde im ELISPOT mithilfe von immobilisiertem (A, C) hC2-ETA und (B, D) FVIII in Doppelbestimmung analysiert. Die Detektion der Bindung erfolgte mit einem HRP-gekoppelten Ziege-anti-Maus-Antikörper (A, B). Hier ist jeweils repräsentativ eine Abbildung der in Doppelbestimmung erfolgten ELISPOT-Analyse gezeigt (C, D). Die Spotanzahl wurde mithilfe eines ELIScan® und der zugehörigen Software EliAnalyse® ausgelesen. Fehlerbalken kennzeichnen die SA des Mittelwertes von Duplikaten. Die Signifikanz wurde mittels One-Way-ANOVA-Test analysiert. Ein p-Wert kleiner als 0.05 galt dabei als statistisch signifikant (** p < 0.01; *** p < 0.001).

Die Inkubation der Splenozyten mit FVIII und dem Immuntoxin hC2-ETA führte zu einer konzentrationsabhängigen Eliminierung hC2-spezifischer B-Zellen, wobei schon die Zugabe äquimolarer Mengen von hC2-ETA (0.04 nM) im Vergleich zu FVIII in einer signifikanten Reduktion hC2-spezifischer Spots resultierte. Die Zugabe des 100-fachen molaren Überschusses an hC2-ETA gegenüber FVIII führte zur

vollständigen Eliminierung aller hC2-spezifischer B-Zellen (Abbildung 19A, C). Das Kontrollprotein ETA hatte hingegen selbst in dieser Konzentration keinen Effekt auf hC2-spezifische B-Zellen. Dies zeigt, dass das Fehlen der zellbindenden Domäne die Internalisierung des Toxins und die damit verbundene Entfaltung der toxischen Aktivität verhinderte. Interessanterweise führte die Inkubation von 4 nM HSA-hC2 ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion an hC2-spezifischen Spots. Bereits Hausl *et al.* konnten zeigen, dass hohe FVIII-Konzentrationen die Restimulation zu ASZ inhibieren, wobei dies auch für die Anwendung einzelner FVIII-Domänen gilt¹⁸⁵.

Auf die Gesamtpopulation FVIII-spezifischer B-Zellen hatte die Zugabe von hC2-ETA weniger reduzierende Effekte, allerdings konnte auch hier eine Abnahme FVIII-spezifischer Spots beobachtet werden (Abbildung 19B, D). Die Zugabe von 0.04 nM hC2-ETA führte zu einer Reduktion von ca. 30 % und auch mit Zugabe höherer hC2-ETA-Konzentrationen konnte keine höhere Eliminierungseffizienz erreicht werden. Für HSA-hC2 konnte erst bei Zugabe von 4 nM eine Abnahme der Spots beobachtet werden. Dies geht einher mit den Ergebnissen, die für die Abnahme an hC2-spezifischen Spots beobachtet wurde. Die Zugabe von ETA hatte auch hier keinen Effekt auf die FVIII-spezifischen B-Zellen. In Abbildung 18B wurde bereits gezeigt, dass die hC2-spezifische Immunantwort nur einen Teil der FVIII-spezifischen Immunantwort ausmacht. An dieser Stelle konnte keine lineare Abnahme der FVIII-spezifischen Spots mit Zugabe von hC2-ETA beobachtet werden. Aufgrund dieser Varianz ist die Reduktion an FVIII-spezifischen Spots durch Zugabe von hC2-ETA nicht signifikant.

Allgemein ist der reduzierende Einfluss von hC2-ETA auf FVIII-spezifische B-Zellen abhängig vom Anteil an hC2-spezifischen B-Zellen. Hier konnte gezeigt werden, dass hC2-ETA dazu in der Lage ist, *ex vivo* durch Eliminierung hC2-spezifischer B-Zellen einen sichtbaren Effekt auf die Gesamtheit FVIII-spezifischer B-Zellen auszuüben. Daher wurde im weiteren Verlauf getestet, ob hC2-ETA auch *in vivo* hC2-spezifische B-Zellen in immunisierten FVIII^(-/-)-Mäusen eliminieren kann.

3.2.3 Eliminierung hC2-spezifischer B-Zellen *in vivo*

Im vorigen Kapitel konnte gezeigt werden, dass hC2-ETA dazu in der Lage ist, hC2-spezifische B-Zellen aus FVIII^(-/-)-Mäusen vollständig zu eliminieren. Um die

Eliminierungseffizienz von hC2-ETA in einer therapienahen Anwendung zu testen, wurde hC2-ETA auch *in vivo* in immunisierten FVIII^(-/-)-Mäusen angewendet. Hierzu musste zunächst die maximale hC2-ETA-Dosis ermittelt werden, die von naiven FVIII^(-/-)-Mäusen toleriert wurde (maximal tolerierte Dosis, MTD). Dazu erhielten je zwei Tiere an zwei aufeinanderfolgenden Tagen intravenös (i. v.) 200 µl DPBS mit je 0, 2.5, 5, 10 oder 20 µg hC2-ETA in eine der lateralen Schwanzvenen. Die Tiere wurden anschließend mehrere Stunden beobachtet, um auftretende Reaktionen hinsichtlich Unverträglichkeiten wie z. B. Apathie sofort erkennen zu können. Die Mäuse, die je 20 µg/Tag hC2-ETA erhielten, überlebten die folgenden 24 h nach der letzten Injektion nicht. Bei der Untersuchung der Organe der verstorbenen Tiere wies die Leber ein "fleckiges" Erscheinungsbild auf, welches auf Lebertoxizität durch Behandlung mit hC2-ETA hindeuten könnte. Alle anderen Tiere wurden noch bis 14 Tage nach der zweiten Injektion beobachtet und zeigten bis dahin keine äußerlich erkennbaren Reaktionen hinsichtlich einer Unverträglichkeit, woraufhin die MTD für hC2-ETA auf 10 µg hC2-ETA/Tag/Maus (entspricht etwa 0.5 mg/kg Körpergewicht) für je zwei aufeinanderfolgende Tage festgelegt wurde. Um nun die Eliminierungseffizienz hC2-spezifischer B-Zellen zu testen, sollten FVIII-immunisierte Tiere mit hC2-ETA behandelt und die daraus resultierende Eliminierung der hC2-spezifischen Gedächtnis-B-Zellen *in vivo* durch FVIII-Restimulation der Splenozyten *ex vivo* überprüft werden. Eine schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs des Versuchsaufbaus ist in Abbildung 20A dargestellt.

Die Tiere wurden wie unter 3.2.2 zunächst wöchentlich mit je 2 IU FVIII immunisiert. Die Präsenz einer Immunantwort in Form von FVIII-spezifischen Antikörpern wurde an Tag 27, noch vor der letzten FVIII-Injektion an Tag 28, im ELISA überprüft (Abbildung 20B). Im Anschluss erhielten die Mäuse an Tag 31 und 32 entweder je 10 µg hC2-ETA oder die äquimolare Menge ETA in 200 µl PBS oder nur 200 µl PBS. Einen Tag nach der letzten Injektion (Tag 33) erfolgte die Blut- und Milzentnahme mit anschließender Präparation der Splenozyten.

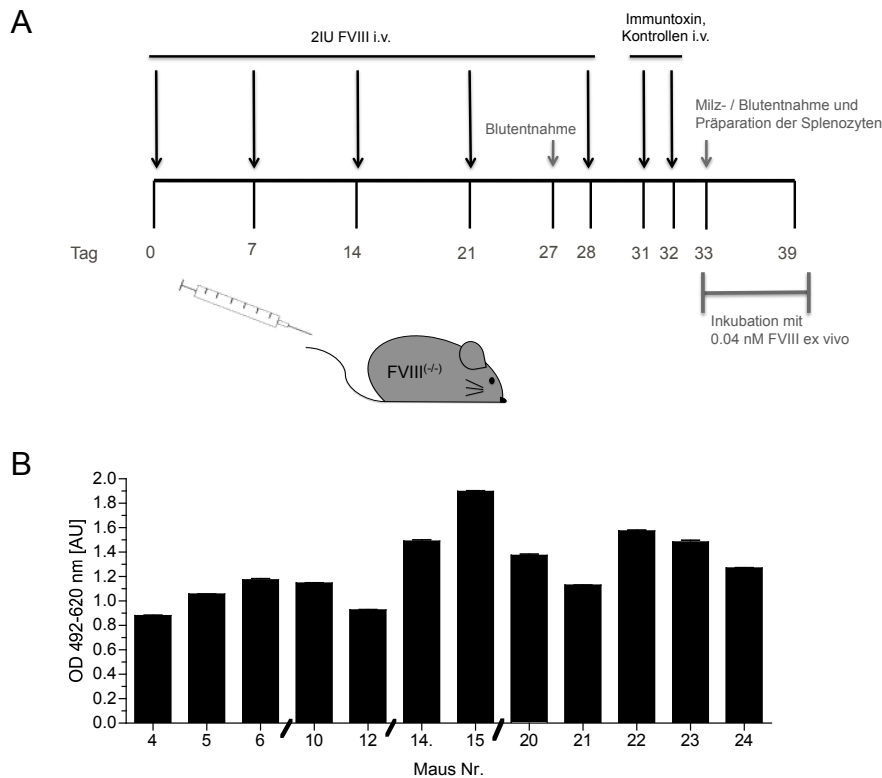


Abbildung 20: Schematische Darstellung zum zeitlichen Ablauf der Eliminierung hC2-spezifischer B-Zellen und Analyse der FVIII-spezifischen Immunantwort. (A) 8-12 Wochen alte Mäuse wurden vier Wochen lang mit je wöchentlich 2 IU FVIII immunisiert. Nach Überprüfung der FVIII-spezifischen Immunantwort wurden die Tiere randomisiert und erhielten an Tag 31 und 32 entweder je 10 µg hC2-ETA, die äquimolare Menge ETA oder nur 200 µl PBS. An Tag 33 wurden die Tiere narkotisiert, das Blut und die Milz entnommen und die anschließend präparierten Splenozyten sechs Tage lang in Anwesenheit von 0.04 nM FVIII restimuliert. (B) FVIII-spezifische Antikörperantwort der im Versuch verwendeten Tiere (siehe Mausnummern) im ELISA. Aus dem am Tag 27 jeweils abgenommenen Blut wurde das Plasma gewonnen und 1:300 verdünnt auf immobilisierten FVIII gegeben. Die Detektion der Antikörperbindung erfolgte mithilfe eines HRP-konjugierten Ratte-anti-Maus-Antikörpers. Die Versuchsergebnisse unterschiedlicher Tage sind durch einen Strich in der X-Achse (/) voneinander getrennt. Fehlerbalken kennzeichnen die SA des Mittelwertes von Duplikaten.

Analog zu 3.2.2 wurden die Splenozyten daraufhin sechs Tage in Anwesenheit von 0.04 nM FVIII inkubiert, um die Differenzierung FVIII-spezifischer Gedächtnis-B-Zellen zu ASZ zu induzieren.

Im vorigen Kapitel konnte bereits gezeigt werden, dass der reduzierende Einfluss von hC2-ETA auf die Gesamtpopulation FVIII-spezifischer B-Zellen aufgrund der Polyklonalität der FVIII-spezifischen Immunantwort begrenzt ist. Aufgrund dessen lässt sich der Einfluss von hC2-ETA *in vivo* auf die FVIII-spezifischen B-Zellen zwischen den Versuchstieren nur schwer vergleichen. Folglich wurde an dieser Stelle auf die Analyse der gesamten restimulierten FVIII-spezifischen ASZ verzichtet und nur die Anzahl an hC2-spezifischen restimulierten ASZ betrachtet. Die Analyse der hC2-spezifischen restimulierten ASZ fand im ELISPOT mit hC2-ETA als immobilisiertem Antigen statt (Abbildung 21).

Nach der Inkubation von Splenozyten aus immunisierten FVIII^(-/-)-Mäusen ohne FVIII konnten im Durchschnitt drei Spots pro *well* auf immobilisiertem hC2-ETA im ELISPOT detektiert werden (Hintergrund). Daher galt die vollständige Eliminierung hC2-spezifischer Gedächtnis-B-Zellen in der Milz als erfolgreich, sofern drei oder weniger hC2-spezifische Spots auf der ELISPOT-Membran detektiert werden konnten.

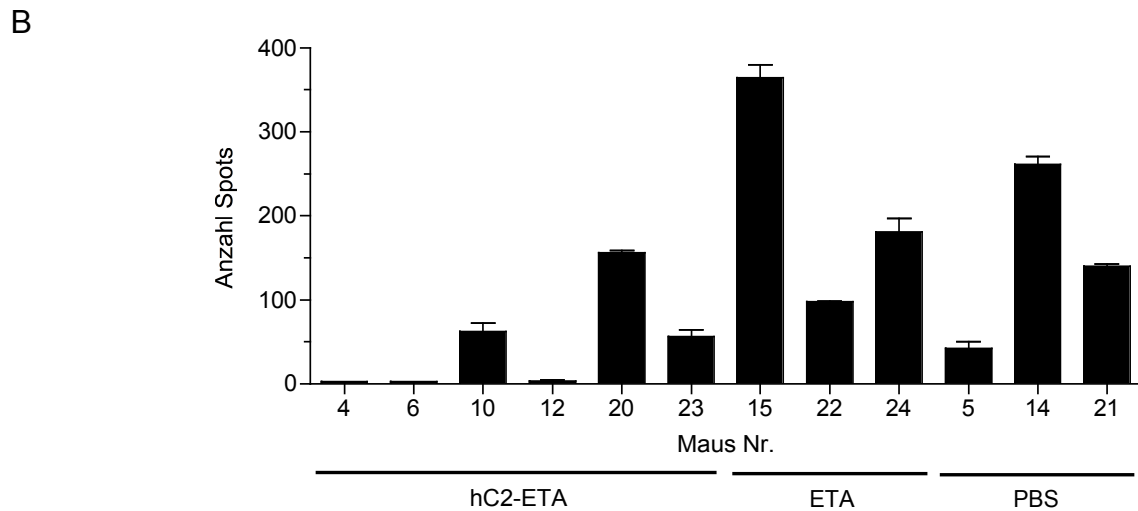
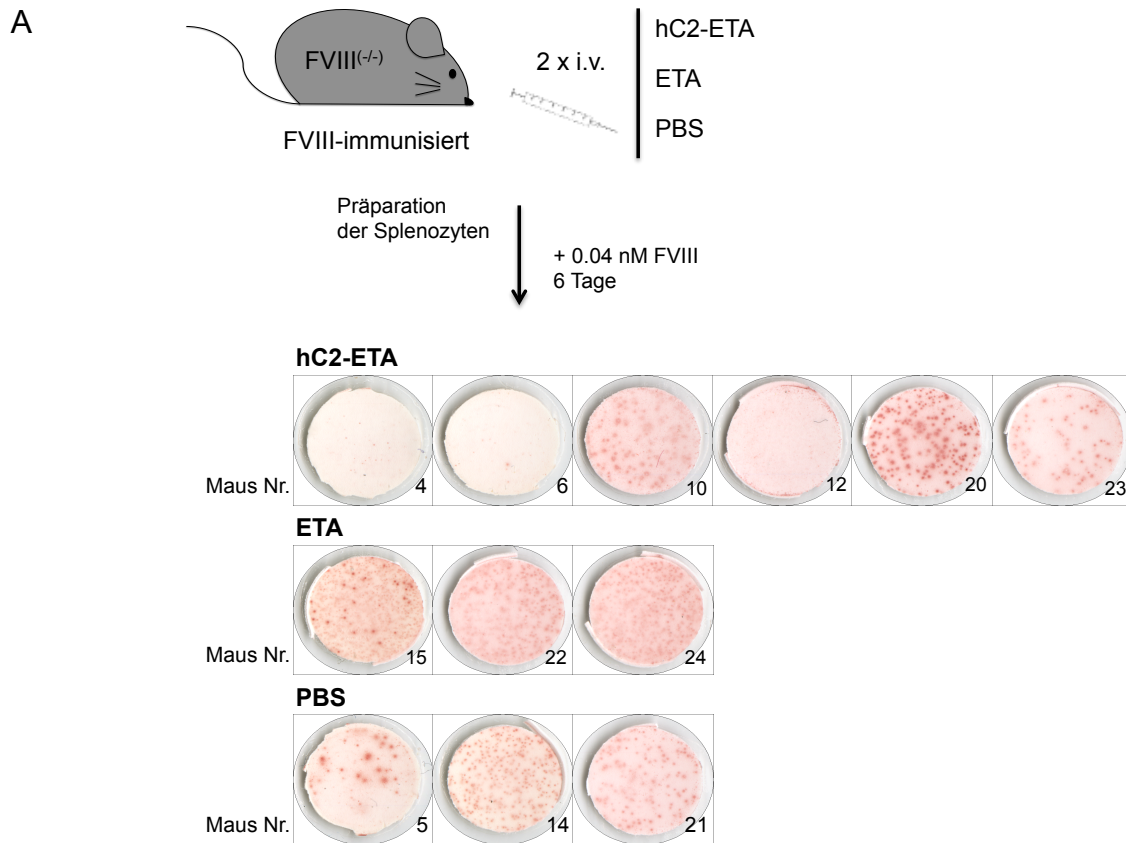


Abbildung 21: Eliminierung hC2-spezifischer B-Zellen *in vivo*. FVIII-immunisierte $FVIII^{-/-}$ -Mäuse erhielten je zwei Injektionen von 10 μ g hC2-ETA (Maus Nr. 4, 6, 10, 12, 20, 23), eine äquimolare Menge ETA (Maus Nr. 15, 22, 24) oder 200 μ l PBS (Maus Nr. 5, 14, 21). Die Splenozyten der behandelten Tiere wurden anschließend sechs Tage mit 0.04 nM FVIII zur Restimulation von FVIII-spezifischen Gedächtnis-B-Zellen zu ASZ inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin zu immobilisiertem hC2-ETA auf die ELISPOT-Membran gegeben. Die Detektion der von den ASZ sekretierten hC2-spezifischen Antikörper wurde mithilfe eines HRP-konjugierten Ziege-anti-Maus-Antikörpers nachgewiesen. (A) Hier ist jeweils repräsentativ ein *well* der in Doppelbestimmung erfolgten ELISPOT-Analyse gezeigt. (B) Darstellung der jeweiligen in Doppelbestimmung erfolgten Auszählung der Spots aus (A). Die Spotanzahl wurde mithilfe eines ELIScan® und der zugehörigen Software EliAnalyse® ausgelesen. Die Eliminierung hC2-spezifischer B-Zellen galt als erfolgreich, sofern weniger als drei Spots auf der Membran detektiert werden konnten. Fehlerbalken kennzeichnen die SA des Mittelwertes von Duplikaten.

Die in Abbildung 21 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Hälfte der mit hC2-ETA behandelten Mäuse keine hC2-spezifischen Spots aufwiesen (Maus Nr. 4, 6, 12), wobei bei den restlichen Tieren hC2-spezifische ASZ detektiert werden konnten (Nr. 10, 20, 23). Somit war die vollständige Eliminierung aller hC2-spezifischen B-Zellen *in vivo* bei 50 % der mit hC2-ETA behandelten Tiere erfolgreich. Weiterhin weisen alle Tiere, denen ETA oder PBS appliziert wurde, Spots und somit hC2-spezifische Gedächtnis-B-Zellen auf. Dies zeigt, dass die Behandlung mit ETA ohne zellbindende Domäne keinen toxischen und somit reduzierenden Einfluss auf die Zielzellen hatte. Ob bei den Immuntoxin-behandelten Mäusen, bei denen die Eliminierung der hC2-spezifischen B-Zellen nicht vollständig erfolgte, dennoch ein Teil der B-Zellen mithilfe von hC2-ETA selektiv angesteuert und eliminiert wurde, konnte mithilfe der hier verwendeten Methode nicht festgestellt werden. Außerdem konnten die Spotanzahlen aufgrund der individuellen Unterschiede zwischen den Versuchstieren keiner statistischen Analyse unterzogen werden.

Im letzten Kapitel konnte gezeigt werden, dass hC2-ETA dazu in der Lage war, hC2-spezifische Gedächtnis-B-Zellen *ex vivo* vollständig zu eliminieren. Es stellte sich daher die Frage, warum die vollständige Eliminierung *in vivo* nicht bei allen Versuchstieren erfolgreich war. Ein Grund hierfür könnte sein, dass die applizierte Menge hC2-ETA zur vollständigen Eliminierung der Gedächtnis-B-Zellen nicht ausgereicht hat. Dies könnte zum einen darauf zurückzuführen sein, dass hC2-ETA *in vivo* unspezifisch an z. B. Endothelzellen gebunden hat und daher nur ein Teil des applizierten Immuntoxins weiter in Zirkulation verblieb. Zum anderen ist es sehr wahrscheinlich, dass appliziertes hC2-ETA von zirkulierenden hC2-spezifischen Antikörpern noch vor Erreichen des Wirkortes gebunden wurde. Hierbei muss auch erwähnt werden, dass die *in vivo* vorhandenen ASZ aufgrund des fehlenden BZR nicht selektiv angesteuert werden können und daher trotz Gabe des Immuntoxins weiter hC2-spezifische Antikörper sekretieren.

Um zu untersuchen, ob das applizierte hC2-ETA von hC2-spezifischen Antikörpern *in vivo* gebunden wurde, wurden die Signalintensitäten der hC2-spezifischen Antikörper vor der Behandlung (Tag 27) und nach der Behandlung (Tag 33) mit hC2-ETA, ETA oder PBS im ELISA analysiert. An beiden Tagen erfolgten Blutabnahmen, sodass das daraus gewonnene Plasma zur Überprüfung der Präsenz freier hC2-spezifischer

Antikörper verwendet werden konnte (Abbildung 22). Der Test sollte zeigen, ob die Behandlung mit hC2-ETA etwas an der Menge der frei vorliegenden Antikörper in Zirkulation geändert hat.

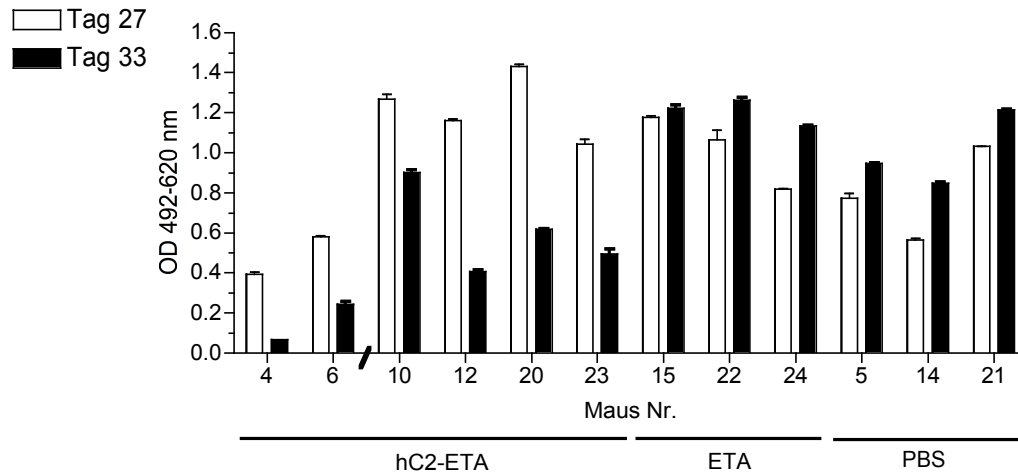


Abbildung 22: Analyse der hC2-spezifischen Immunantwort der mit hC2-ETA oder Kontrollen behandelten FVIII^(-/-)-Mäuse. Untersuchung der hC2-spezifischen Immunantwort im ELISA. An den Tagen 27 und 33 wurde jeweils Blut abgenommen und das daraus gewonnene Plasma 1:100 verdünnt und in Doppelbestimmung auf immobilisiertes hC2-ETA gegeben. Die Detektion der gebundenen Antikörper erfolgte mithilfe eines HRP-konjugierten Ratte-anti-Maus-Antikörpers. Die Versuchsergebnisse unterschiedlicher Tage sind durch einen Strich in der X-Achse (/) voneinander getrennt. Fehlerbalken kennzeichnen die SA des Mittelwertes von Duplikaten.

Die Ergebnisse in Abbildung 22 zeigen, dass die Signalintensitäten der hC2-spezifischen Antikörper bei allen mit hC2-ETA-behandelten Tieren an Tag 33 niedriger ausfielen als an Tag 27. Alle auf diese Weise behandelten Tiere hatten an Tag 33 jedoch noch hC2-spezifische Antikörper. Es ist zu beachten, dass die Signalintensitäten der Tiere Nr. 4 und 6 nicht mit dem Rest verglichen werden können, da die ELISAs an jeweils unterschiedlichen Tagen erfolgten. Tiere, denen entweder ETA oder nur PBS injiziert wurde, wiesen im Gegensatz zu hC2-ETA-behandelten Tieren sogar höhere Signalintensitäten an Tag 33 auf. Dies zeigt, dass weder ETA noch PBS Einfluss auf die hC2-spezifischen Antikörper hatten.

Die Ergebnisse deuten an, dass in allen hC2-ETA-behandelten Tieren ein Teil des jeweils injizierten hC2-ETA von hC2-spezifischen Antikörpern gebunden wurde, sodass diese Antikörper im ELISA nicht mehr nachweisbar sind. Um dies genauer zu untersuchen, wurden die Plasmen von Tag 33 hitzeinaktiviert und die Signalintensitäten der hC2-spezifischen Antikörper in hitzeinaktiviertem und nicht inaktiviertem Plasma vergleichend gemessen (Abbildung 23). Die Hitzeinaktivierung

soll durch Denaturierung von hC2-ETA möglicherweise vorliegende Antigen-Antikörperbindungen oder auch Immunkomplexe auflösen, sodass die hC2-spezifischen Antikörper im ELISA nachgewiesen werden können.

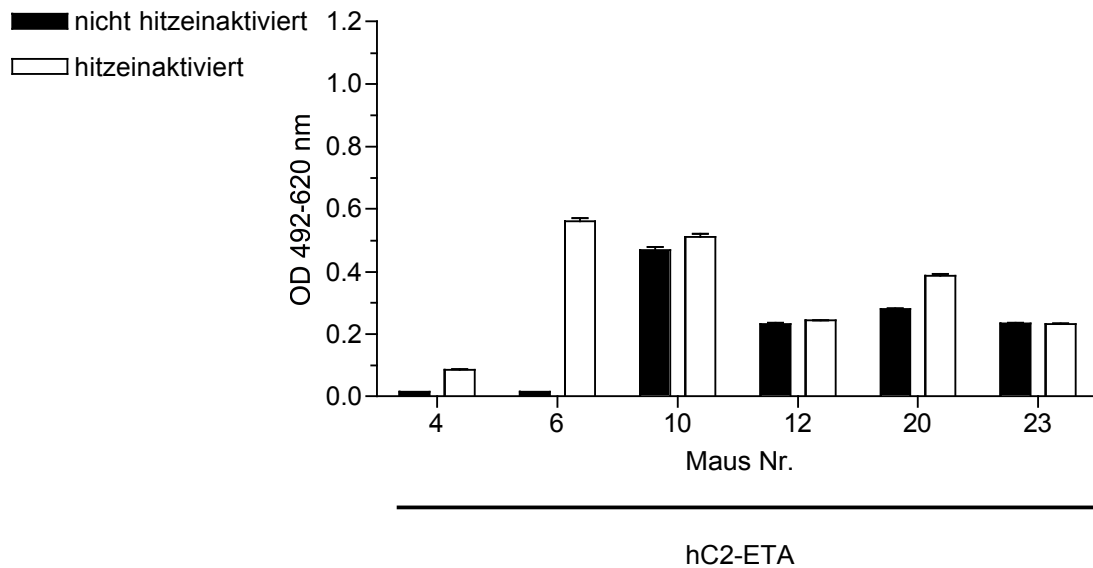


Abbildung 23: Analyse der hC2-spezifischen Immunantwort der mit hC2-ETA behandelten FVIII^(-/-)-Mäuse mithilfe hitzeinaktivierter und nicht hitzeinaktivierter Plasmen. Untersuchung der hC2-spezifischen Immunantwort im ELISA. Aus dem am Tag 33 abgenommenen Blut wurde das Plasma gewonnen und jeweils ein Aliquot 45 min bei 56°C hitzeinaktiviert. Sowohl das hitzeinaktivierte als auch das nicht hitzeinaktivierte Plasma wurden 1:100 verdünnt und in Doppelbestimmung auf immobilisiertes hC2-ETA gegeben. Die Detektion der gebundenen Antikörper erfolgte mithilfe eines HRP-konjugierten Ratte-anti-Maus-Antikörpers. Fehlerbalken kennzeichnen die SA des Mittelwertes von Duplikaten.

Abbildung 23 zeigt, dass die Plasmen von Tag 33 der Mäuse Nr. 4, 6, 10 und 20 nach der Hitzeinaktivierung höhere hC2-spezifische Signalintensitäten aufweisen. Dies deutet darauf hin, dass in der nicht inaktivierten Probe hC2-spezifische Antikörper hier teilweise gebunden an hC2-ETA vorliegen. Da die Signalintensitäten der inaktivierten und nicht inaktivierten Proben bei Maus Nr. 4 und 6 deutliche Unterschiede aufweisen, scheint hier der Großteil an hC2-spezifischen Antikörpern an hC2-ETA gebunden zu sein. Der Anteil an gebundenen hC2-spezifischen Antikörpern ist bei den Tieren Nr. 10 und 20 wesentlich niedriger. Bei den Tieren Nr. 12 und 23 konnten keine gebundenen hC2-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. Allerdings muss hierbei beachtet werden, dass solche Immunkomplexe *in vivo* weiter prozessiert werden und daher möglicherweise teilweise oder nicht mehr nachweisbar sind¹⁸⁶. Die Ergebnisse aus Abbildung 22 und Abbildung 23 zeigen,

dass appliziertes hC2-ETA von zirkulierenden hC2-spezifischen Antikörpern gebunden und teilweise weiter prozessiert worden ist.

Trotz der hier gewonnenen Erkenntnisse, scheinen die Mechanismen der humoralen Immunantwort und dem damit verbundenen Abfangen des Immuntoxins weitaus komplexer zu sein, da auch bei den Tieren mit vollständiger B-Zelleliminierung noch freie Antikörper nachgewiesen werden konnten. In diesem Zuge muss allerdings noch einmal betont werden, dass die ASZ nicht selektiv eliminiert werden können und auch noch nach der letzten Toxingabe Antikörper produzieren. Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Signalintensität freier hC2-spezifischer Antikörper und der erfolgreichen Eliminierung aller hC2-spezifischer B-Zellen lässt sich hier nicht feststellen.

Betrachtet man die hier vorgestellten Ergebnisse, lässt sich dennoch schlussfolgern, dass bei den Tieren Nr. 4, 6 und 12 die applizierte Menge hC2-ETA vermutlich ausgereicht hat, um i) die humorale hC2-spezifische Immunantwort zu überwinden ii) an den Wirkort zu gelangen und iii) alle hC2-spezifischen B-Zellen zu eliminieren. Da bei allen mit hC2-ETA behandelten Tieren, nicht jedoch bei den mit PBS oder ETA behandelten Tieren, das Bindungssignal hC2-spezifischer Antikörper nach der Behandlung erniedrigt war, lässt sich außerdem vermuten, dass durch die Behandlung mit hC2-ETA sich keine neuen ASZ mehr ausgebildet haben.

Bei den Tieren Nr. 10, 20 und 23 scheint durch das Abfangen von hC2-ETA durch hC2-spezifische Antikörper nicht ausreichend freies hC2-ETA für die Eliminierung aller hC2-spezifischer Gedächtnis-B-Zellen verfügbar gewesen zu sein. Eine Erhöhung der Menge an hC2-ETA wurde nicht in Betracht gezogen, da im Vorversuch festgestellt wurde, dass 10 µg hC2-ETA die maximal tolerierte Dosis in naiven Mäusen darstellt.

Bei Milzentnahme an Tag 33 erfolgte ebenfalls die Inaugenscheinnahme aller weiteren Organe, insbesondere der Leber, aufgrund der bereits aufgetretenen Lebertoxizität bei der Behandlung naiver FVIII^(-/-)-Mäuse mit hC2-ETA in Vorversuchen. Das Auftreten von Lebertoxizitäten in Form einer fleckigen Erscheinung der Leber bestätigte sich ebenfalls bei den mit hC2-ETA behandelten Tieren, wenngleich diese keine äußerlich erkennbare Reaktion auf das Immuntoxin

zeigten. Aufgrund der aufgetretenen Lebertoxizität wurde das Experiment an dieser Stelle abgebrochen und somit auf die Vervollständigung der Datensätzen "ETA" und "PBS" verzichtet. Ob die Tiere möglicherweise mehr als zwei aufeinanderfolgende Behandlungstage mit dem Immuntoxin vertragen hätten, wurde ebenfalls nicht weiter analysiert. Weiterhin wurde kein Versuchstier mit HSA-hC2 behandelt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die applizierte Menge hC2-ETA bei der Hälfte der Versuchstiere zu einer vollständigen Eliminierung hC2-spezifischer B-Zellen geführt hat, wobei die Kontrollen PBS und ETA keinen sichtbaren Einfluss auf die Zahl hC2-spezifischer B-Zellen hatten. Zudem konnte das Antikörper-Signal hC2-spezifischer Antikörper reduziert werden. Zur erfolgreichen Eliminierung aller hC2-spezifischen B-Zellen muss die applizierte Menge hC2-ETA an die Höhe der individuellen hC2-spezifischen Immunantwort angepasst werden, sodass nach Überwindung der Antikörper-basierten Immunantwort genug hC2-ETA an den Wirkort gelangen kann, um alle hC2-spezifischen B-Zellen eliminieren zu können.

4 Diskussion

4.1 Produktion und Charakterisierung der Immuntoxine und Kontrollen

Die Immuntoxine hC2-ETA und hA2-ETA sowie die Kontrolle ETA konnten bakteriell exprimiert und aufgereinigt werden. Da die rekombinanten Proteine über direkten Zellaufschluss (Sonifizierung) gewonnen wurden, ist die Aufreinigung von Abbauprodukten oder noch nicht vollständig synthetisierten Produkten möglich. Dies zeigte sich vor allem in der Erscheinung mehrerer UV-Elutionspeaks während der IMAC-basierten Aufreinigung der Proteine aus dem Bakterienlysat. Mithilfe von Gelelektrophorese konnten die jeweiligen Proteinfractionen, die den Großteil des Proteins mit korrektem Molekulargewicht enthielten, ausgemacht werden. Die Reinheit der finalen Proteingemische wurde ebenfalls mithilfe gelelektrophoretischer Methoden analysiert. Hier hat sich gezeigt, dass alle aufgereinigten Proteine dennoch Abbauprodukte enthielten. Dies ist vor allem auf die Lage der His-tags zurückzuführen, wobei sich einer sowohl am N-Terminus der Proteine (HSA-hC2) als auch integral (hC2-ETA, hA2-ETA, ETA) befindet. Daher kann bei der Aufreinigung nicht sichergestellt werden, dass nur vollständig synthetisierte Proteine mithilfe der Affinitätschromatographie eluiert werden. Gelelektrophoretische Analysen des jeweiligen Endproduktes haben jedoch gezeigt, dass der Hauptanteil der Lösung aus dem jeweiligen vollständigen Protein besteht.

Bei der bakteriellen zytoplasmatischen Proteinproduktion können aufgrund der vorherrschenden reduzierenden Bedingungen keine Disulfidbrücken ausgebildet werden. Dies kann Einfluss auf die Ausbildung der korrekten Konformation des exprimierten Proteins haben. Im Falle der FVIII-Domänen ist die korrekte Konformation für die Bindung an den BZR unerlässlich, da neben linearen häufig auch konformationelle Epitope von FVIII-Inhibitoren erkannt werden^{107,187}. Die native hC2-Domäne enthält eine Disulfidbrücke (Cys2174-Cys2326). Trotz Expression in einem nicht modifizierten *E. coli* Stamm, besaß die hC2-Domäne innerhalb des Immuntoxins hC2-ETA die korrekte Konformation, da eine Reihe konformationeller Epitope von monoklonalen hC2-spezifischen Antikörpern im ELISA erkannt worden sind¹⁷⁹. Dies zeigt, dass die hC2-Domäne, trotz eukaryotischen Ursprungs und nicht ausgebildeter Disulfidbrücke, bereits mit der korrekten Konformation löslich im

Zytoplasma von *E. coli* exprimiert wird. Dies geht mit bereits publizierten Daten einher, die zeigen, dass die Anwesenheit der Disulfidbrücke für die korrekte Faltung der hC2-Domäne nicht notwendig ist¹⁸⁸⁻¹⁹⁰.

Die Analyse der *in vitro*-Stabilität von hC2-ETA sowohl im Plasma naiver FVIII^(-/-)-Mäuse als auch in PBS hat gezeigt, dass Komponenten wie z. B. Proteasen aus dem Plasma zwar keinen Einfluss auf das Immuntoxin haben, jedoch die Inkubation über 48 h bei 37°C teilweise zum Verlust der korrekten Konformation führte. Hingegen erwies sich die Konformation der hC2-Domäne innerhalb von FVIII als relativ stabil. Dies könnte zum einen auf das Fehlen der Disulfidbrücke zwischen Cys2174 und Cys2326 zurückzuführen sein. Wenngleich sie für die korrekte Konformation zwar nicht notwendig ist, könnte sie diese möglicherweise stabilisieren¹⁹¹. Die Stabilität der hC2-Domäne ist außerdem abhängig von intramolekularen Wechselwirkungen mit der hC1- und der hA1-Domäne, welche bei hC2-ETA nicht anwesend sind^{192,193}. Daher kann es hier möglicherweise schneller zu Temperatur-induzierten strukturellen Konformationsänderungen und so auch zur Denaturierung des Proteins kommen. Frühere Experimente mit FVIII haben gezeigt, dass FVIII nach 24 h Inkubation in Plasma über 80 % seiner Aktivität verliert¹⁹⁴. Dies liegt im Gegensatz zur hier gezeigten relativ stabilen Konformation der hC2-Domäne innerhalb von FVIII *in vitro* vor allem an der Thrombin-Aktivierung und der Dissoziation einzelner Domänen, vor allem der hA2-Domäne^{195,196}. Aufgrund dessen kann die Stabilität der Konformation innerhalb von FVIII hier nicht mit dem schnellen Verlust der Aktivität *in vitro* verglichen werden.

Im Gegensatz zur hC2-Domäne besitzt die hA2-Domäne zwei strukturelevante intramolekulare Disulfidbrücken (Cys528-Cys554; Cys630-Cys711). Daher wurde das Immuntoxin hA2-ETA in OrigamiTM 2 und nicht wie hC2-ETA in ClearColi® exprimiert. Eine weitere Möglichkeit wäre die Produktion im Periplasma von ClearColi gewesen, da hier oxidierende Bedingungen herrschen, was die Ausbildung von Disulfidbrücken erlaubt. Allerdings ist hA2-ETA mit 82 kDa sehr groß, was die Translokation des Polypeptides vom Zytoplasma in das Periplasma erschweren könnte. Aus diesem Grund wurde der Produktion in OrigamiTM 2 der Vorzug gewährt. Nach Produktion und Aufreinigung von hA2-ETA ergab die weitere Charakterisierung jedoch, dass die hA2-Domäne nicht in der richtigen Konformation vorlag. Dies zeigte

sich, da von fünf monoklonalen hA2-spezifischen Antikörpern, nur einer, nämlich GMA-012, eine Bindung an hA2-ETA aufwies. Das Epitop von GMA-012 liegt in einem linearen (sequentiellen) Bereich zwischen Glu604 und Arg740. Daher deutet die alleinige Bindung von hA2-ETA an GMA-012 entweder auf Denaturierung oder falsche Faltung der hA2-Domäne hin^{107,179}. Dies wird durch Abwesenheit der Bindung von 1D4 und 4F4 bestätigt, welche jeweils ein konformationelles Epitop erkennen^{161,179}. Das Epitop der mAbs 4A4 und 2-76 liegt wiederum in einem linearen Bereich, allerdings an einer anderen Stelle (Asp403-His444) wie das Epitop von GMA-012. Diese mAbs wiesen ebenfalls keine Bindung an hA2-ETA auf, was darauf hindeutet, dass das Inhibitor-Epitop durch falsche Faltung der hA2-Domäne nicht mehr exponiert vorlag^{107,179}.

Weiterhin ist es bei der Produktion von rekombinanten Proteinen in Origami™ 2 auch möglich, dass es während der Synthese sowohl zur Bildung von nicht-nativen als auch intermolekularen Disulfidbrücken kommt¹⁹⁷. Dies könnte die Struktur des Proteins ebenfalls negativ beeinflusst haben.

Während die Produktion von hC2-ETA und ETA gute Ausbeuten erzielte (> 1.2mg/l Bakterienkultur), war die Produktion von hA2-ETA mit 150 µg/l Bakterienkultur schlecht. Dies ist neben der falschen Faltung der hA2-Domäne ein weiterer Hinweis darauf, dass sich *E. coli* nicht zur rekombinanten Herstellung von löslichem hA2-ETA eignet.

Eine Möglichkeit, bei der generell höhere Ausbeuten bei der Proteinproduktion erreicht werden können, ist die Aufreinigung aus sogenannten *inclusion bodies*. Dies sind Proteinaggregate, die aus zum Teil unvollständigen und falsch gefalteten bzw. denaturierten Proteinen bestehen und sich bei exzessiver Synthese von Proteinen in *E. coli* bilden. Da bei dieser Vorgehensweise die denaturierten Proteine anschließend *in vitro* renaturiert werden müssen, könnte dies eine Möglichkeit darstellen, hA2-ETA in der richtigen Konformation zu erhalten. Während die Aufreinigung aus dem löslichen Teil des Zytoplasmas aus *E. coli* relativ einfach ist, ist die Aufreinigung von in *inclusion bodies* befindlichen Proteine ein aufwendiger Prozess¹⁹⁸. Um am Ende des Produktionsprozesses das Protein mit korrekter Konformation zu erhalten, werden die *inclusion bodies* zunächst mithilfe chaotroper Substanzen gelöst, während die Proteine im Anschluss über aufwendige, dem

jeweiligen Protein individuell angepasste Methoden renaturiert werden müssen¹⁹⁹. Die Renaturierung erfolgt grundsätzlich durch Entfernung der chaotropen Substanz und kann zum Beispiel mithilfe von Verdünnung der proteinhaltigen Lösung, Dialyse oder Festphasen-Separation durchgeführt werden. Weiterhin müssen auch hier die fehlenden Disulfidbrücken ausgebildet werden. Bei diesem Prozess ist die Bildung von Disulfidbrücken zwischen den richtigen Cysteinen ebenfalls nicht garantiert und auch die Bildung intermolekularer Disulfidbrücken nicht ausgeschlossen. Daher kann man hier auch nach der Renaturierung von einer Heterogenität des präparierten Proteins ausgehen.

Die Faltung der katalytischen Untereinheit ETA wurde weder in den beiden Immuntoxinen noch in der Kontrolle weiter analysiert, da die toxische Wirkung erst durch Denaturierung und Reduktion innerhalb der Zielzelle entfaltet wird^{200,201}. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass ein polyklonaler anti-ETA-Antikörper spezifisch an ETA und auch an hC2-ETA gebunden hat.

Im Vergleich zur bakteriellen Proteinexpression bietet die Proteinproduktion in Säugerzellen viele Vorteile hinsichtlich Proteinfaltung und posttranslationaler Modifizierungen wie z. B. Glykosylierungen. Daher ist es nicht verwunderlich, dass etwa 60-70 % aller rekombinant hergestellten pharmazeutischen Proteine in Säugetier-Zelllinien hergestellt werden²⁰². Darüber hinaus werden die produzierten Proteine in das Medium sekretiert, sodass für die Aufreinigung der Aufschluss der Zellen nicht erforderlich ist. Das Kontrollprotein HSA-hC2 wurde in der humanen Zelllinie HEK293T hergestellt und aus dem Zellmedium aufgereinigt. Da humane Zellen über einen hochentwickelten Faltungsapparat verfügen, ist es nicht verwunderlich, dass die hC2-Domäne innerhalb von HSA-hC2 auch in der korrekten Konformation vorlag. Die Fusion von humanem Serum Albumin als Trägerprotein an die hC2-Domäne erhöhte die Ausbeute um ein Vielfaches, sodass es unserer Arbeitsgruppe auch möglich war, weitere einzelne FVIII-Domänen wie die hA2- und die hC1-Domäne in Fusion mit HSA in humanen Zellen zu produzieren¹⁰⁴. Wie auch die hC2-Domäne lagen die hA2- und die hC1-Domäne korrekt gefaltet vor¹⁰⁴. Da die Produktion einer korrekt gefalteten hA2-Domäne in *E. coli* nicht möglich war, stellen HEK-Zellen daher eine weitere Möglichkeit zur Produktion dar.

Allerdings sind Säugerzellen für die Expression von proteinbasierten Immuntoxinen nur bedingt geeignet, da das jeweilige Toxin in der Regel Apoptose in diesen Zellen auslöst. Aufgrund dessen müsste die A2-Domäne im Anschluss an die Proteinproduktion *in vitro* an ein Toxin kovalent gekoppelt werden. Die Vor- und Nachteile solcher Toxin-Konjugate werden im weiteren Verlauf der Diskussion noch einmal aufgegriffen (siehe 4.2.3).

4.2 Untersuchung der Eliminierungseffizienz von hC2-ETA

4.2.1 Eliminierung der hC2-spezifischen Hybridoma-Zelllinie BO2C11

Da das Immuntoxin hC2-ETA mit der richtigen Konformation der zellbindenden Domäne exprimiert wurde, wurde dessen Eliminierungseffizienz zunächst *in vitro* auf Zellen der Hybridomazelllinie BO2C11 analysiert. Im Kapitel 3.1.1 wurde gezeigt, dass der sekretierte FVIII-Inhibitor BO2C11 an hC2-ETA bindet. Somit sollte es durch Inkubation von hC2-ETA mit BO2C11-Hybridomas zur spezifischen Bindung an membranständigen BO2C11 kommen, gefolgt von der Internalisierung des Immuntoxins und der damit verbundenen Entfaltung der toxischen Aktivität von ETA. Mithilfe des MTT-Assays wurde bestimmt, dass hC2-ETA in der Lage ist, etwa 38 % der vorhandenen Zellen zu eliminieren. Leider war auch durch Steigerung der Immuntoxin-Konzentration keine höhere Eliminierungsrate zu erreichen. Im Gegensatz hierzu hatte ETA in denselben Konzentrationen keinen signifikanten Einfluss auf die Lebendzellzahl. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Zellen durch Bindung und Internalisierung von hC2-ETA eliminiert wurden. In vorigen hier nicht gezeigten Experimenten wurde die Konzentration von hC2-ETA auf bis zu 1 μ M erhöht. Hierbei konnte die Lebendzellzahl zwar weiter reduziert werden, die Inkubation mit ETA hatte aber auch einen ähnlich reduzierenden Einfluss auf die Lebendzellzahl. Die Analyse der *in vitro*-Stabilität im Kapitel 3.1.1 ergab, dass hC2-ETA bei Inkubation bei 37°C die korrekte Konformation der hC2-Domäne verliert. Da jedoch nach 24 Stunden Inkubation das Immuntoxin erneut hinzugegeben wurde, kann ausgeschlossen werden, dass die begrenzte Eliminierungseffizienz auf Degradation des Immuntoxins zurückzuführen ist. Durch die erneute Zugabe kann ebenfalls ausgeschlossen werden, dass hC2-ETA von sekretiertem BO2C11 gebunden wurde und deshalb den BZR der Zielzellen nicht erreichen konnte. Die

Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein Teil der Zellen entweder nicht in der Lage ist, hC2-ETA spezifisch zu binden und/oder hC2-ETA korrekt zu internalisieren.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, sind die genauen molekularen Voraussetzungen für die Internalisierung eines Antigens nach Bindung an den BZR noch nicht hinreichend aufgeklärt⁷³⁻⁷⁵. Es ist jedoch sicher, dass hC2-ETA ohne membranständigen BO2C11 die Zielzelle auch nicht spezifisch binden kann. Aus der Literatur ist außerdem bekannt, dass viele immortalisierte B-Zelllinien keinen BZR bzw. membranständiges Ig (mIg) exprimieren^{149,182,203,204}. Daher wurden die BO2C11-Hybridomas zunächst auf die Expression des BZR sowohl durch Überprüfung des Korezeptors CD79a als auch der membranständigen Form von Ig analysiert. Die qualitative Analyse im Westernblot ergab, dass die Zelllinie beides exprimierte. Weitere quantitative durchflusszytometrische Untersuchungen ergaben jedoch, dass nur knapp 6.5 % der Zellen den Korezeptor CD79a exprimierten¹⁸². Im Gegensatz hierzu waren allerdings über 90 % der Zellen in der Lage, die C2-Domäne zu binden. Diese Bindung könnte allerdings auch von BO2C11-Antikörpern ausgehen, die sich gerade im Transit über die Membran befinden. Die Sekretion des hoch affinen BO2C11 durch die Hybridoma-Zelllinie konnte mittels Westernblot über die Detektion der sekretierten Form der schweren Antikörperkette nachgewiesen werden. Weiterhin erfolgte auch in hier nicht gezeigten Experimenten der direkte Nachweis von sekretiertem BO2C11 aus dem Zellkulturüberstand. BO2C11 muss auf seinem Weg in das Zellmedium auch die Membran passieren. Es ist daher möglich, dass die sich im Transit befindlichen BO2C11-Antikörper ebenfalls in der Lage sind, die C2-Domäne zu binden. Der genaue Anteil an Zellen, die tatsächlich die membranständige Form von BO2C11 tragen, konnte daher nicht quantifiziert werden.

Ähnliche Ergebnisse zur Expression des BZR in B-Zellhybridomas erhielten wir bereits bei der Analyse einer hA2-Domänen-spezifischen Hybridomazelllinie aus der Maus. Diese konnte zwar mithilfe eines scFvs spezifisch angefärbt werden, jedoch wiesen nur 1.3 % der Zellen eine Expression des Korezeptors CD79b auf¹⁴⁹. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass bei einigen Hybridoma-Zelllinien nur ein Bruchteil der Zellen einen BZR auf der Oberfläche exprimiert. Es ist möglich, dass der membranständige BO2C11 bei einem Großteil der Zellen nicht mit CD79a assoziiert ist. Da 38 % der Zellen eliminiert werden konnten, scheint im Falle der BO2C11-

Hybridomas die Anwesenheit von CD79a für die Internalisierung des Antigens nicht zwingend notwendig zu sein. Weiser *et al.* konnten bereits zeigen, dass die Korezeptoren CD79a und CD79b für die Internalisierung des Antigenrezeptors bei einer bestimmten Hybridomazelllinie ebenfalls nicht notwendig sind²⁰⁵. Es ist auch durchaus möglich, dass nur ein Teil des membranständigen BO2C11 in der Lage ist, gebundenes Antigen zu internalisieren. Weiterhin bleibt die Frage offen, ob und inwieweit die Transit-Antikörper bei der Internalisierung eine Rolle spielen.

Neben dem fehlenden BZR-Korezeptor könnte auch die artifizielle Immortalisierung mithilfe des Epstein-Barr-Virus (EBV) Einfluss auf die Internalisierung haben. Die Infektion durch EBV in B-Zellen führt zur konstitutiven Expression des latenten Membranprotein 2A (LMP2A). Dykstra *et al.* konnten zeigen, dass LMP2A sowohl die Signalübertragung des BZR, als auch die Internalisierung und Prozessierung des BZR-Antigen-Komplexes blockiert. Damit reduziert das Virus *in vivo* die Erkennung EBV-infizierter Zellen durch Inhibition der B-Zellaktivierung²⁰⁶.

Die hier durchgeführten Analysen geben leider keinen endgültigen Aufschluss darüber, warum nur 38 % der Zellen mithilfe von hC2-ETA eliminiert werden konnten. Da nur etwa 6.5 % der Zellpopulation den Korezeptor CD79a trägt, ist davon auszugehen, dass nur dieser kleine Teil der Zellen einen BZR exprimiert. Warum hC2-ETA mehr als 6.5 % der Zellen eliminieren konnte, ist nicht geklärt. Insgesamt weisen die Ergebnisse darauf hin, dass die Hybridomazelllinie BO2C11 hinsichtlich der Oberflächenpräsentation des Antikörpers sehr divers ist. Aufgrund dessen und aufgrund der Immortalisierung mit EBV eignet sich diese Zelllinie nicht als Modell für eine genauere Analyse der *in vitro*-Eliminierungseffizienz von hC2-ETA.

4.2.2 Eliminierung hC2-spezifischer B-Zellen *ex vivo*

Im weiteren Verlauf wurde die Eliminierungseffizienz von hC2-ETA auf FVIII-spezifischen Gedächtnis-B-Zellen *ex vivo* bestimmt. Bei Bindung des Antigens an Gedächtnis-B-Zellen kommt es zum einen zur Internalisierung des Antigens und zum anderen zur Signalübertragung des BZR, sodass sich aus Gedächtnis-B-Zellen ASZ differenzieren. Diese Differenzierung ist, wie bereits in der Einleitung beschrieben, anhängig von der Interaktion mit CD4⁺ T-Zellen. Die Differenzierung zu ASZ resultiert in der Sekretion von Antikörpern und damit einer effektiven Immunantwort. Die in diesem Versuch verwendeten Gedächtnis-B-Zellen stammen aus der Milz von

FVIII^(-/-)-Mäusen. Die Tiere wurden für die Induktion einer FVIII-spezifischen Immunantwort mehrere Wochen lang mit FVIII immunisiert. Die Existenz der FVIII-spezifischen Immunantwort wurde durch die Präsenz FVIII-spezifischer IgG-Antikörper nachgewiesen, welche impliziert, dass zum einen ASZ und aufgrund dessen auch Gedächtnis-B-Zellen gebildet worden sind.

Die Bindung von FVIII an den BZR dieser Gedächtnis-B-Zellen führt wiederum zu deren Differenzierung zu ASZ und damit auch zur Sekretion FVIII-spezifischer Antikörper. Dieser Mechanismus wurde verwendet, um die Eliminierungseffizienz von hC2-ETA auf FVIII-spezifische Gedächtnis-B-Zellen *ex vivo* zu untersuchen. Die Restimulation FVIII-spezifischer Gedächtnis-B-Zellen in Anwesenheit von FVIII kann im ELISPOT mittels Detektion FVIII-spezifischer Antikörper nachgewiesen werden. Die Zugabe von hC2-ETA soll hingegen zur Apoptose der Gedächtnis-B-Zellen führen, die somit nicht mehr restimuliert werden können. Tatsächlich konnte in Anwesenheit von hC2-ETA ein konzentrationsabhängiges Ausbleiben der Restimulation beobachtet werden, wohingegen das Toxin ohne zellbindende Domäne keinen Einfluss auf die Anzahl der hC2-spezifischen B-Zellen hatte. Dies zeigt, dass hC2-ETA in der Lage ist, hC2-spezifische B-Zellen selektiv zu eliminieren. Bereits die Zugabe äquimolarer Mengen von hC2-ETA im Vergleich zu FVIII führte zu einer signifikanten Reduktion von hC2-spezifischen Spots. Dies deutet darauf hin, dass die hC2-spezifischen Gedächtnis-B-Zellen eine hohe Sensitivität gegenüber hC2-ETA aufweisen. Ein 100-facher Überschuss von hC2-ETA gegenüber FVIII führte zur vollständigen Eliminierung aller hC2-spezifischen Gedächtnis-B-Zellen.

In der Vergangenheit beobachteten Hausl *et al.*, dass die Restimulation FVIII-spezifischer Gedächtnis-B-Zellen aus FVIII^(-/-)-Mäusen bei Zugabe von FVIII-Mengen, die über die physiologische Konzentration von 1 IU/ml (0,4 nM) hinausgingen, irreversibel inhibiert wurde¹⁸⁵. Diese Inhibition konnte nicht nur durch Volllängen-FVIII, sondern auch von einzelnen FVIII-Domänen ausgelöst werden. Es wurde angenommen, dass die Inhibition in beiden Fällen durch direkte BZR-Antigen-Interaktion zur Caspase-abhängigen Induktion von Apoptose führt²⁰⁷.

Aus diesem Grund wurde, neben der Überprüfung unspezifischer Effekte durch das Toxin ETA, auch die Auswirkungen der Anwesenheit der hC2-Domäne überprüft. Tatsächlich hatte die Inkubation der Zellen mit HSA-hC2 einen reduzierenden

Einfluss auf die Restimulation der Gedächtnis-B-Zellen. Allerdings konnte erst bei einer Konzentration von 4 nM eine signifikante Reduktion der hC2-spezifischen Spots beobachtet werden. Diese Konzentration entspricht dem 100-fachen Überschuss gegenüber der Konzentration an hC2-ETA (0.04 nM), die ebenfalls eine signifikante Reduktion verursachte. Aufgrund dessen kann davon ausgegangen werden, dass die Eliminierung der hC2-spezifischen B-Zellen bei Inkubation mit hC2-ETA durch spezifische Bindung und Internalisierung des Immuntoxins verursacht wurde. Hausl *et al.* postulierten außerdem, dass bereits Konzentrationen ab 0.4 nM zur Inhibition der Restimulation führen. In den hier aufgezeigten Experimenten zeigte sich allerdings, dass Konzentrationen ab 4 nM zusätzlich zu den 0.04 nM FVIII denselben Effekt aufwiesen. Ein Grund hierfür könnte die Art des verwendeten Splenozyten-Pools sein. In den Experimenten von Hausl *et al.* wurden vor der Inkubation die *in vivo* gebildeten CD138-positiven (CD138⁺) ASZ aus dem Splenozyten-Pool entfernt, da diese die *ex vivo*-Kultivierung überlebt und somit das Versuchsergebnis beeinflusst hätten^{159,185}. Dies steht im Gegensatz zu den hier gezeigten Versuchsergebnissen, bei denen die *in vivo* gebildeten ASZ nach sechs Tagen in Kultur nicht mehr anhand sekretierter Antikörper nachweisbar waren und somit das Versuchsergebnis nicht beeinflusst haben. ASZ sekretieren fortwährend Antikörper, welche sowohl FVIII, als auch hC2-ETA und HSA-hC2 binden und somit wiederum deren Bindung an den BZR verhindern können. Die sekretierten hC2-spezifischen Antikörper der CD138⁺ ASZ binden somit auch *ex vivo* an das Antigen und könnten somit die höheren Konzentrationen, die für die Reproduktion der Versuchsergebnisse benötigt wurden, erklären. Die Depletion der CD138⁺ ASZ wurde nicht vorgenommen, da die Zellen einerseits keinen störenden Einfluss auf das Experiment hatten. Zum anderen stellt die Verwendung eines CD138⁺ Splenozyten-Pools die Situation in Inhibitor-Patienten eher dar, da in Patienten ebenfalls FVIII-spezifische ASZ und Antikörper zirkulieren.

Es wurde auch der Einfluss von hC2-ETA auf die Gesamtpopulation der FVIII-spezifischen B-Zellen analysiert. Hier kam es ebenfalls zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der Spots ab der Zugabe von 0.04 nM hC2-ETA und auch bei Zugabe von 4 nM HSA-hC2. Diese Ergebnisse gehen einher mit den Daten zur Reduktion der hC2-spezifischen Spots. Somit hatte die Zugabe von hC2-ETA auch einen reduzierenden Effekt auf die Gesamtpopulation der FVIII-

spezifischen B-Zellen. Der Einfluss eines FVIII-Domänen-Toxins ist natürlich abhängig von den jeweils Domänen-spezifischen Gedächtnis-B-Zellen im FVIII-spezifischen Repertoire. Die Analyse der FVIII-spezifischen Antikörper im Plasma ergab, dass ein Großteil der Antikörper gegen die hA2- und die hC2-Domäne gerichtet ist. Da es bisher noch nicht gelungen ist, weitere FVIII-Domänen einzeln bzw. in Fusion mit HSA herzustellen, kann über das Vorhandensein weiterer für die hA1- bzw. die hA3-Domäne spezifische Antikörper keine Aussage getroffen werden. Aufgrund bereits publizierter Daten ist allerdings davon auszugehen, dass auch diese einen Anteil der FVIII-spezifischen Immunantwort ausmachen^{101,103,208}. Hierbei muss allerdings beachtet werden, dass die Signalintensität der Domänen-spezifischen Antikörper nicht notwendigerweise mit der Häufigkeit der Domänen-spezifischen Gedächtnis-B-Zellen korreliert. Dennoch gibt die Untersuchung der Antikörperspezifitäten Aufschluss über die generelle Zusammensetzung der Immunantwort.

Die Anwendung weiterer FVIII-Domänen-Immuntoxine könnte die Anzahl FVIII-spezifischer Gedächtnis-B-Zellen weiter reduzieren. Wie sich im ersten Kapitel bereits gezeigt hat, eignen sich Bakterien allerdings nur bedingt für die Produktion von FVIII-Domänen-Immuntoxinen. Eine hierauf Bezug nehmende Diskussion sowie Lösungsansätze für dieses Problem werden im weiteren Verlauf der Diskussion noch einmal aufgegriffen.

4.2.3 Eliminierung hC2-spezifischer B-Zellen *in vivo*

Die Anwendung von hC2-ETA in immunisierten FVIII^(-/-)-Mäusen führte in der Hälfte der Tiere zur vollständigen Eliminierung aller hC2-spezifischen Gedächtnis-B-Zellen aus der Milz. Die vergleichende Analyse der Signalintensität hC2-spezifischer Antikörper aus den Plasmen der behandelten Tiere deutete darauf hin, dass appliziertes hC2-ETA durch hC2-spezifische Antikörper gebunden wurde. Aufgrund dessen lässt sich schlussfolgern, dass in der Hälfte der Tiere die applizierte Menge hC2-ETA vermutlich nicht ausgereicht hat, um (i) die humorale Immunantwort zu überwinden, (ii) an den Wirkort zu gelangen und (iii) schließlich alle hC2-spezifischen Gedächtnis-B-Zellen zu eliminieren. Eine Erhöhung der Dosis des Immuntoxins wurde nicht in Betracht gezogen, da die applizierte Menge der maximal tolerierten Dosis (MTD) in naiven FVIII^(-/-)-Mäusen entsprach.

Generell könnte auch eine Verlängerung der Behandlung über zwei Tage hinaus die Eliminierungseffizienz erhöhen. Aufgrund der aufgetretenen Lebertoxizität wurde dieser Ansatz nicht weiterverfolgt. Dennoch ist mithilfe der hier durchgeführten Methoden nicht ausgeschlossen, dass die Tiere eine häufigere Behandlung mit hC2-ETA trotz Lebertoxizität überlebt hätten und sich möglicherweise auch davon erholen würden. Ob und inwieweit die beobachtete Lebertoxizität die Mortalität bei Anwendung von hC2-ETA beeinflusst hätte, kann an dieser Stelle nicht geklärt werden. Lebertoxizität ist eine häufig auftretende Nebenwirkung bei ETA-basierten Immuntoxinen, wobei die genaue Ursache bei Anwendung von hC2-ETA hier nicht genauer untersucht wurde²⁰⁹⁻²¹². Es ist möglich, dass hC2-ETA auf unspezifische Weise mit Hepatozyten interagiert. Eine solche unspezifische Interaktion mit der negativen Membran von Leberzellen wurde bei der Anwendung eines CD25-spezifischen ETA-basierten Immuntoxins (LMB-2) in Leukämie- und Lymphompatienten beobachtet, wobei es hier durch Kupffer-Zellen zur Sekretion von TNF- α und somit zur Leberschädigung kam²¹³. Durch Austausch einzelner Reste innerhalb der konstanten Region des scFvs konnte die Lebertoxizität gesenkt werden²¹⁴. Wie in der Einleitung bereits beschrieben, ist die negativ geladene Phospholipidmembran aktivierter Thrombozyten ein wichtiger Interaktionspartner für die hC2-Domäne, wobei die Bindung aber auch durch die Interaktion weiterer FVIII-Domänen stabilisiert wird¹⁹². Aufgrund dessen ist es vorstellbar, dass hC2-ETA unspezifisch mit negativ geladenen Oberflächen von z. B. Hepatozyten interagiert und somit die beobachtete Lebertoxizität ausgelöst hat. Falls sich dies bewahrheiten würde, müsste man davon ausgehen, dass hC2-ETA auch weitere Nebenwirkungen durch Bindung an gesundes Gewebe auslösen könnte. Diese unspezifische Bindung mit negativ geladenen Oberflächen könnte außerdem dazu beigetragen haben, dass ein Teil des applizierten hC2-ETA seinen Wirkort nicht erreicht hat und die Eliminierung der hC2-spezifischen Gedächtnis-B-Zellen nur teilweise erfolgt ist.

Die *in vivo*-Gabe der Kontrolle HSA-hC2 hat in diesem Experiment aufgrund des Abbruchs keine Anwendung gefunden. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass die Eliminierung der Gedächtnis-B-Zellen teilweise durch die Präsenz der hC2-Domäne ausgelöst wurde. Dass hohe Dosen FVIII die Restimulation von Gedächtnis-B-Zellen *ex vivo* inhibieren, wurde bereits in Kapitel 3.2.2 beschrieben. Dieselbe Arbeitsgruppe hat außerdem CD138⁻ Splenozyten aus FVIII-immunisierten FVIII^(-/-)-

Mäusen in naive Mäuse transferiert und die Differenzierung in CD138⁺ ASZ nach einmaliger FVIII-Gabe durch Bildung FVIII-spezifischer Antikörper beobachtet¹⁸⁵. Hier konnte ebenfalls festgestellt werden, dass die *in vivo*-Restimulation der transferierten Splenozyten mit FVIII-Mengen ab 20 µg inhibiert wurde. Da es sich bei diesem Experiment allerdings um transferierte ASZ-negative Splenozyten aus einem anderen System handelt und die Inhibition durch FVIII und nicht bloß durch eine einzelne FVIII-Domäne ausgelöst wurde, ist dieses Ergebnis nicht ohne weiteres auf das hier angewendete System übertragbar.

Zunächst einmal ist es für den generellen Therapierfolg nicht notwendigerweise von Belang, ob die Gedächtnis-B-Zellen durch die Präsenz der hC2-Domäne oder durch Bindung und Internalisierung des Immuntoxins eliminiert worden sind. Die Standardtherapie für Inhibitor-Patienten besteht nämlich ebenfalls in der Induktion von Toleranz durch regelmäßige hoch-dosierte Gaben von FVIII, was allerdings bei etwa 30 % der Inhibitor-Patienten nicht erfolgreich ist¹³⁶. Da im vorliegenden Fall die applizierte Menge hC2-ETA nicht immer ausgereicht hat, um alle hC2-spezifischen Gedächtnis-B-Zellen zu eliminieren und die Immuntoxin-Dosis nicht beliebig erhöht werden kann, würde eine kombinierte Therapie aus FVIII und hC2-ETA möglicherweise die Eliminierungseffizienz erhöhen. Der applizierte FVIII wäre in der Lage, die hC2-spezifischen Antikörper zu binden und würde damit die Eliminierung der Gedächtnis-B-Zellen durch hC2-ETA erleichtern. Im Umkehrschluss würde die kombinierte Therapie aus konventioneller ITI und der Gabe von Immuntoxinen den Erfolg für die Induktion von Toleranz möglicherweise erhöhen.

Neben der bereits beschriebenen Lebertoxizität kann bei der Behandlung mit Immuntoxinen außerdem auch das sogenannte Vascular-Leak-Syndrom als Nebenwirkung auftreten. So können nicht nur ETA-basierte, sondern auch Ricin-A- oder Saporin-basierte Immuntoxine zur Permeabilisierung der Blutgefäße und damit auch zur Paravasation von Flüssigkeiten und Proteinen in das Interstitium führen. Das Austreten solcher Flüssigkeiten führt zu Ödemen und kann letztendlich zum Organversagen führen²¹⁵.

Der größte Nachteil bei der Anwendung von Protein-basierten Immuntoxinen *in vivo* ist allerdings die Entwicklung einer Toxin-spezifischen Immunantwort. Das Auftreten neutralisierender Antikörper hängt hier von der jeweiligen Indikation und dem

vorgesehen Behandlungsplan ab. So entwickelten etwa 44 % der Patienten während der Behandlung mit Moxetumomab pasudotox, einem CD22-spezifischen ETA-basierten Immuntoxin, neutralisierende Antikörper, während die Behandlung mit einem anderen ebenfalls CD22-spezifischen Immuntoxin BL22 in 24 % der Patienten zur Entwicklung solcher Antikörper führte²¹⁶. Generell liegt die Inzidenz für die Entwicklung neutralisierender Antikörper bei hämatologischen Krebserkrankungen nach dreimaliger Gabe zwischen 0 % und 40 %. Bei der Anwendung von ETA-basierten Immuntoxinen bei soliden Tumoren liegt sie sogar zwischen 50 % und 100 %. Viele Ansätze hinsichtlich der Reduktion der Immunogenität wurden bereits verfolgt. So wurde zum Beispiel versucht, durch PEGylierung und damit einhergehender Maskierung von potenziellen Epitopen zum einen die Immunogenität zu reduzieren, als auch die Halbwertszeit zu verlängern. Die PEGylierung von Immuntoxinen resultierte allerdings in einer reduzierten Toxizität²¹⁷. Durch die Identifikation humaner B- und T-Zellepitope sowie durch die Deletion großer Teile der Toxinsequenz konnten neue ETA-basierte Immuntoxine entwickelt werden, die eine reduzierte Immunogenität aufwiesen. Die Beibehaltung der Toxizität bei gleichzeitiger Reduktion der Immunogenität stellt allerdings immer noch eine große Herausforderung dar¹⁶⁹. Die Therapie von Inhibitor-Patienten mit ETA-basierten FVIII-Domänen-Immuntoxinen, vor allem in Kombination mit einer ITI, wäre allerdings sehr wahrscheinlich wesentlich kürzer als die von Krebspatienten. Dies könnte das Risiko der Entwicklung neutralisierender Antikörper gegen ETA erheblich verringern.

Eine Möglichkeit, die Immunogenität von Protein-basierten Toxinen zu umgehen, ist die Entwicklung von FVIII-Domänen-Toxinkonjugaten. Diese sind wesentlich weniger immunogen und werden durch kovalente Kopplung der FVIII-Domäne an eine zytotoxische chemische Komponente mithilfe eines Linkers hergestellt. Die Verwendung von Toxinkonjugaten anstelle von Toxin-Fusionsproteinen würde außerdem die Produktion weiterer FVIII-Domänen-Toxine erheblich erleichtern, da die Kopplung der FVIII-Domäne *in vitro* erfolgen würde und somit das Expressionssystem für die FVIII-Domäne nicht auf *E. coli* beschränkt wäre. In der Vergangenheit konnten wir bereits neben hC2-HSA sowohl die hA2- als auch die hC1-Domäne als HSA-Fusionsproteine in HEK293T-Zellen mit korrekter Konformation erfolgreich produzieren und aufreinigen¹⁰⁴. Neben der korrekten Konformation, besitzen die in HEK293T-Zellen produzierten FVIII-Domänen auch ein

humanes Glykosylierungsmuster, welches bei in *E. coli* exprimierten Proteinen nicht vorhanden ist²¹⁸.

Es wurde bereits mehrfach erwähnt, dass die *in vivo* gebildeten ASZ aufgrund des fehlenden BZR nicht spezifisch angesteuert und eliminiert werden können. Diese bleiben bis zur natürlichen Apoptose erhalten und sekretieren bis dahin weiter Antikörper. Ein Grund dafür, dass bei der Behandlung mit Rituximab nur etwa 50 % der Inhibitor-Patienten ansprechen, könnte eben diese Langlebigkeit der ASZ sein.²¹⁹ Während die reguläre Halbwertszeit einer ASZ 1-10 Tage beträgt konnten FVIII-spezifische ASZ aus immunisierten Mäusen bis zu 22 Wochen detektiert werden^{184,220}. Sogenannte langlebige ASZ (engl. *long-lived plasma cells*, LLPC) können sogar bis zu sechs Monate im Knochenmark bestehen²²¹. Nach der vollständigen Eliminierung der Gedächtnis-B-Zellen können sich allerdings keine neuen ASZ mehr differenzieren, sodass die bereits etablierte Antikörper-basierte Immunantwort nicht auf Dauer beibehalten werden kann²²².

Weiterhin muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass eine erneute Entwicklung der hC2-spezifischen Immunantwort auch nach Eliminierung aller hC2-spezifischen Gedächtnis-B-Zellen durch hC2-ETA nicht ausgeschlossen bleibt. Sowohl nach erfolgreicher ITI als auch nach der erfolgreichen Behandlung mit Rituximab konnte eine wiederkehrende FVIII-spezifische Immunantwort durch Neudifferenzierung naiver B-Zellen beobachtet werden²²³.

Die Anwendung von FVIII-Domänen-Immuntoxinen ist dennoch sehr vielversprechend, denn eine Kombination aus ITI und FVIII-Domänen-Immuntoxinen könnte möglicherweise die Erfolgsquote der ITI erhöhen und zu einer schnelleren Induktion von Toleranz führen. Zusätzlich bietet die Verwendung von FVIII-Domänen-Immuntoxinen die Möglichkeit, die Therapie individuell an die Immunantwort des Patienten anzupassen und somit die Nebenwirkungen zu minimieren. Die Analyse der Immunantwort könnte anhand der im Plasma befindlichen Antikörper mithilfe des hier bereits verwendeten ELISAs, *homologue scanning mutagenesis* und weiteren bereits publizierten Methoden erfolgen¹⁰⁴.

4.3 Fazit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung und Evaluierung von FVIII-Domänen-Immuntoxinen. Im Zuge dessen wurden die immundominanten Domänen hA2 und hC2 jeweils an eine verkürzte Version des Exotoxins A aus *Pseudomonas aeruginosa* fusioniert und exprimiert. Während das bakterielle Expressionssystem für hA2-ETA nicht geeignet war, konnte hC2-ETA neben weiteren Kontrollproteinen mit der korrekten Konformation hergestellt und aufgereinigt werden.

Die Fähigkeit zur selektiven Eliminierung hC2-spezifischer B-Zellen wurde im weiteren Verlauf sowohl *in vitro* mithilfe der hC2-spezifischen Hybridomazelllinie als auch *ex vivo* und *in vivo* mithilfe von Splenozyten aus FVIII-immunisierten FVIII^(-/-)-Mäusen untersucht. Hierbei hat sich gezeigt, dass die Hybridomazelllinie aufgrund des fehlenden BZR für die Analyse der Eliminierungseffizienz nicht geeignet war. Durch Inkubation der Splenozyten aus FVIII-immunisierten FVIII^(-/-)-Mäusen mit hC2-ETA, konnten hC2-spezifische B-Zellen vollständig und konzentrationsabhängig eliminiert werden. Auch die mehrfache Applikation von hC2-ETA in FVIII-immunisierten FVIII^(-/-)-Mäusen führte bei der Hälfte der Tiere zur vollständigen Eliminierung aller hC2-spezifischen B-Zellen und zur Reduktion des hC2-spezifischen Antikörpersignals in allen mit hC2-ETA behandelten Tieren. Die hier beobachtete limitierte Eliminierungseffizienz ist vermutlich auf die Präsenz hC2-spezifischer Antikörper zurückzuführen, die einen Teil des applizierten Immuntoxins abgefangen haben, sodass nicht alle hC2-spezifischen Gedächtnis-B-Zellen erreicht und eliminiert werden konnten. Um die Eliminierungseffizienz von hC2-ETA weiter zu erhöhen, müsste das Behandlungsprotokoll geändert werden. Hierbei könnte sowohl eine Verlängerung des Behandlungszeitraums als auch eine kombinierte Therapie aus FVIII und hC2-ETA zur vollständigen Eliminierung der Gedächtnis-B-Zellen in allen Versuchstieren führen.

Die Ausweitung des hier vorgestellten Ansatzes auf weitere FVIII-Domänen ist generell möglich, jedoch muss ein alternatives Expressionssystem aufgrund des eukaryotischen Ursprungs von FVIII in Betracht gezogen werden. Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen dennoch, dass FVIII-Domänen-Immuntoxine ein wirkungsvolles Mittel sind, um FVIII-spezifische B-Zellen selektiv zu eliminieren. Die Anpassung der Gabe von FVIII-Domänen-Immuntoxinen an die individuelle

Immunantwort des Patienten könnte das Auftreten von Nebenwirkungen minimieren. Außerdem könnte eine kombinierte Therapie aus ITI und FVIII-Domänen-Immuntoxinen die Zeit bis zur Induktion von Toleranz verkürzen und die Chancen für den generellen Therapieerfolg erhöhen.

5 Material

5.1 Hersteller

Firma	Abkürzung	Sitz
AELVIS	-	Hannover
AppliChem	-	Darmstadt
Applied Biosystems	-	Darmstadt
Bayer HealthCare	BH	Leverkusen
Becton Dickinson Biosciences	BD	San Jose, CA, USA
Biochrom	-	Cambridge, UK
Biochrom	-	Cambridge, UK
BioRad	-	München
BioTek	-	Winooski, VT, USA
Brand	-	Wertheim
Braun	-	Kronberg
Carl Roth	CR	Karlsruhe
Carl Zeiss AG	-	Oberkochen
Dianova/Jackson		Hamburg
Edmund Bühler	-	Hechingen
Eppendorf	-	Hamburg
Excel Scientific	-	Victorville, CA, USA
Fluka, Sigma Aldrich	-	St. Louis, MO, USA
GE Healthcare	-	Little Chalfont, UK

Gibco (Thermo Fisher Scientific)	-	Waltham, MA, USA
Graham-Field	-	Atlanta, GA, USA
GraphPad Prism Inc.	-	La Jolla, CA, USA
Green Mountain Antibodies	GMA	Burlington, VT, USA
Greiner	-	Kremsmünster, Schweiz
Hans Dinslage GmbH	-	Uttenweiler
Heraeus	-	Hanau
IKA Works	-	Staufen
Integra Biosciences	-	Ziters, Schweiz
Invitrogen	-	Carlsbad, CA, USA
ISMATEC	-	Grevenbroich
J.T. Baker	-	Hampton, NH, USA
Jackson Laboratory	-	Bar Harbor, MA, USA
Lonza	-	Basel, Schweiz
Lucigen	-	Middleton, WI, USA
Macherey-Nagel	-	Weilmünster
Merck KgaA	Merck	Darmstadt
Merck-Millipore	Millipore	Billerica, MA, USA
Miltenyi Biotec	-	Bergisch Gladbach
Nalge Company	-	Penfield, NY, USA
New England Biolabs	NEB	Frankfurt am Main
Novagen (Merck)	-	Darmstadt

Pfizer	-	New York, NY, USA
Polysciences Inc.	-	Warrington, PA, USA
Roche	-	Basel, Schweiz
Sarsted	-	Nümbrecht
Sartorius	-	Göttingen
Schott	-	Mitterteich
Sekisui Diagnostics	SD	Lexington, MA, USA
Sigma Aldrich	SIA	St. Louis, MO, USA
SO Analytics	-	
Starlab	-	Hamburg
Tecan Group Ltd.	-	Männedorf
Thermo Fisher Scientific	TS	Waltham, MA, USA
VWR	-	Radnor, PA, Vereinigte Staaten

5.2 Bakterienstämme

E. coli Stamm	Genotyp	Herkunft
Top10	F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (araleu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG	Invitrogen
Origami 2 TM (DE3)	Δ (ara-leu)7697 Δ lacX74 Δ phoA P _{vull} phoR araD139 ahpC galE galK rpsL F'[lac+ lacIq pro] (DE3) gor522::Tn10 trxB (StrR, TetR)	Novagen

ClearColi® BL21(DE3)	F– ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm lon λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) msbA148 ΔgutQΔkdsDΔlpxLΔlpxMΔpagPΔlpxPΔeptA	Lucigen
-------------------------	--	---------

5.3 Zelllinien

Name	Beschreibung	Referenz/ Herkunft
HEK293T	adhärente epitheliale Zelllinie aus humanen embryonalen Nierenzellen, enthält das große T-Antigen des SV40 (Simian Virus)	ATCC CRL-11268
BO2C11	humane Hybridoma-Zelllinie, sekretiert den anti-hC2 Inhibitor BO2C11	zur Verfügung gestellt von Marc Jacquemin, Zentrum für molekulare und vaskuläre Biologie, Universität Leuven, Belgien
LE2E9	humane Hybridoma-Zelllinie, sekretiert den anti-hC1 Inhibitor LE2E9	zur Verfügung gestellt von Marc

		Jacquemin, Zentrum für molekulare und vaskuläre Biologie, Universität Leuven, Belgien
Raji	humane B-Zelllinie aus einem Burkitt-Lymphom	ATCC CCL-86

5.4 Versuchstiere

Mausstamm	Beschreibung	Herkunft
B6;129S-F8tm1KAZ/J	FVIII <i>knockout</i> durch Disruption von Exon 16	Jackson Laboratory (Lagernummer 004424)

5.5 Nährmedien

Organismus	Name	Zusammensetzung (Herkunft)
Bakterien Herstellung von Agarplatten durch Zugabe von 15 g/l Agar (CR)	LB _{Lennox}	Trypton 10 g/l Hefeextrakt 5 g/l NaCl 5 g/l pH-Wert 7,0 20 g auf 1 l Medium ansetzen (CR)

	LB _{Luria/Miller}	<p>Trypton 10 g/l</p> <p>Hefeextrakt 5 g/l</p> <p>NaCl 10 g/l</p> <p>pH 7,0</p> <p>25 g auf 1 l Medium ansetzen</p> <p>(CR)</p>
	SOC <i>Outgrowth</i>	<p>2 % (v/v) pflanzliches Peton</p> <p>0.5 % (v/v) Hefeextrakt</p> <p>10 mM NaCl</p> <p>2.5 mM KCl</p> <p>10 mM MgCl₂</p> <p>10 mM MgSO₄</p> <p>20 mM Glukose</p> <p>(NEB)</p>
Zelllinien	DMEM _{comp}	DMEM (Gibco) + 10 % (v/v) FBS, 2 % (v/v) L-Glutamin (SIA), 1 % (v/v) Penicillin-Streptomycin (SIA)
	DMEM _{ITS}	DMEM (Gibco) + 1x ITS (Gibco), 2 % L-Glutamin (SIA), 1 % Penicillin-Streptomycin (SIA)
	DMEM/F12 _{comp}	DMEM/F12 (Gibco) + 10 % (v/v) FBS, 2% (v/v) L-Glutamin (SIA), 1 % (v/v) Penicillin-Streptomycin (SIA)

	DMEM/F12 _{-Phenol}	DMEM/F12 ohne Phenolrot (Gibco) + 10 % (v/v) FBS, 2 % (v/v) L-Glutamin (SIA), 1 % (v/v) Penicillin-Streptomycin (SIA)
	RPMI _{comp}	RPMI 1640 (Gibco) + 10 % (v/v) FBS, 2 % (v/v) L-Glutamin (SIA), 1 % (v/v) Penicillin-Streptomycin (SIA)
Primärzellen	R10	RPMI 1640 (Gibco) + 10 % (v/v) FBS, 2 % (v/v) L-Glutamin (SIA), 1 % (v/v) Penicillin-Streptomycin (SIA), 1:286000 β-Mercaptoethanol (AppliChem)

5.6 Puffer und Lösungen

5.6.1 Puffer und Lösungen für die Molekularbiologie

Name	Zusammensetzung (Herkunft)
6x Gel Loading Dye	NEB
Ampicillin	10000x Stammlösung, 100 mg/ml Ampicillin Natriumsalz in H ₂ O
CaCl ₂ Glycerin	100 mM CaCl ₂ in H ₂ O 15 % (v/v) Glycerin
CaCl ₂ Lösung	100 mM CaCl ₂ in H ₂ O
Cut Smart	NEB
dNTPs	je 10 mM dATP, dCTP, dGTP and dTTP, pH 7.5, (NEB)

HF-Puffer	5x Puffer für <i>Phusion Polymerase</i> (NEB)
IPTG	0.5 M IPTG in H ₂ O
PBS	1:10 aus 10x PBS (Lonza) in H ₂ O
PBS/Glycerin	50 % (v/v) Glycerin in PBS
Tetrazyklin	1000x Stammlösung, 10 mg/ml Tetrazyklin-Base in 70 % (v/v) Ethanol

5.6.2 Puffer und Lösungen für zellbiologische Methoden

Name	Zusammensetzung (Herkunft)
Viabilitätsfarbstoff	APC-Cy7 (eBioscience)
Streptavidin-APC	BioLegend
0.1 % Trypanblau	0.1 % (v/v) Trypanblau in PBS
BD Pharm Lyse® Puffer	10x Puffer (BD)
DMSO/FBS	10 % (v/v) DMSO in FBS (SIA)
DPBS	Dulbeccos Phosphate Buffered Saline (Gibco)
DPBS + 2 % FBS	2 % (v/v) FBS (SIA) in DPBS (Gibco)
FBS	<i>fetal bovine serum</i> (SIA)
HCl/SDS Lösung	0.02 M HCl, 20 % (w/v) SDS in H ₂ O
MTT-Arbeitslösung	1 ml MTT-Stammlösung 4 ml DMEM _{-Phenol}
MTT-Stammlösung	5 mg/ml MTT-Formazan in PBS
PEI	Polyethyleneimine, MW 40.000 linear (Polysciences Inc.)

Trypsin/EDTA	0.5 g/l porcines Trypsin 0.2 g/l EDTA in <i>Hank's Balanced Salt Solution</i> mit Phenolrot (SIA)
--------------	--

5.6.3 Puffer und Lösungen für die proteinchemische Methoden

Name	Zusammensetzung (Herkunft)
0.2 N NaOH	0.2 N NaOH in 95 % (v/v) Ethanol
10 % SDS	10 % (w/v) SDS in H ₂ O
10x HisA	500 mM Na ₂ HPO ₄ 500 mM NaH ₂ PO ₄ 1.5 M NaCl 100 mM Imidazol pH 7
10x SDS-Laufpuffer	0.25 M Tris-HCl , 1.9 M Glycin in H ₂ O
2 M NaCl	2 M NaCl in H ₂ O
2 % BSA	2 % (w/v) BSA (SIA) in PBST
25 % Essigsäure	25 % (v/v) Essigsäure in H ₂ O
30 % Acrylamid/Bisacrylamid	Rotiphorese 30, Verhältnis 37.5:1 (CR)
35 % Ethanol	35 % (v/v) Ethanol in H ₂ O
5 % MPBST	5 % (w/v) Milchpulver in PBST
Acetatpuffer	100 mM Natriumacetat in H ₂ O, pH 5

AEC-Lösung	10 mg/ml in Dimethylformamid
APS	10 % (w/v) Ammoniumpersulfat (SIA) in H ₂ O
Complete™	Protease Inhibitor Cocktail, EDTA-frei, Tabletten (Roche)
EDTA-Dialysepuffer	20 mM MES 100 mM NaCl 80 mM EDTA 0.01 % (v/v) Tween20® pH 6.0
Elutionspuffer	50 mM Na ₂ HPO ₄ 50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 250 mM Imidazol pH 7
Imperial™ Protein Stain	(TS)
LPS-Reinigungspuffer	20 mM Na ₂ HPO ₄ 20 mM NaH ₂ PO ₄ 400 mM NaCl pH 6
Lysepuffer	50 mM Na ₂ HPO ₄ 50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 1mM PMSF

	<p>10 mM Imidazol</p> <p>+ Complete™ (eine Tablette pro 100 ml Bakteriensuspension)</p> <p>pH 7</p>
OPD-Lösung	<p>1 Tablette Phosphat-Citrat Puffer (SIA) in 100 ml H₂O; dazu 2 Tabletten o-Phenylendiamin (SIA)</p>
PBST	<p>0.05% (v/v) Tween20® in PBS</p>
reduzierender Probenauftragspuffer	<p>12.5 % (v/v) Sammelgelpuffer</p> <p>25 % (v/v) Glycerin</p> <p>2 % (w/v) SDS</p> <p>1 % (w/v) Bromphenolblau</p> <p>0.5 % (v/v) β-Mercaptoethanol</p>
Sammelgelpuffer	<p>0.5 M Tris-HCl in H₂O, pH 6.8</p>
SDS-Laufpuffer	<p>1:10 aus 10x Stammlösung in H₂O</p>
Trenngelpuffer	<p>1.5 M Tris-HCl in H₂O, pH 8.8</p>
Waschpuffer	<p>50 mM Na₂HPO₄</p> <p>50 mM NaH₂PO₄</p> <p>300 mM NaCl</p> <p>10 mM Imidazol</p> <p>pH 7</p>
Western Blot Transferpuffer	<p>10 % (v/v) 10x SDS-Laufpuffer</p> <p>20 % (v/v) Methanol in H₂O</p>

5.6.4 Puffer und Lösungen für tierexperimentelle Methoden

Name	Zusammensetzung (Herkunft)
Citratlösung	0.11 M Natriumcitrat in H ₂ O
Ketavet®	100 mg/ml Ketamin (Pfizer)
physiologische Kochsalzlösung	Isotonische NaCl-Lösung, 0.9 % (Braun)
Rompun® 2 %	20 mg/ml Xylazine (Bayer HealthCare)

5.7 Plasmide



Abbildung 24: Plasmidkarte des Vektors pSW220 zu bakteriellen Expression der ETA-Fusionsproteine. Die DNA-Sequenzen der hC2- sowie die hA2-Domäne wurden mithilfe der Restriktionsschnittstellen *Hind*III und *Xba*I in den Vektor kloniert. Zur Produktion von ETA im richtigen DNA-Leserahmen wurde ein Adenin aus dem Vektor pSW220 entfernt. Ori, *origin of replication*; *lacI* Repressorgen (durch Bindung von IPTG inhibiert); AmpR, Ampicillin-Resistenzgen. Das Plasmid wurde freundlicherweise von Winfried Wels (Georg-Speyer-Haus, Frankfurt am Main, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

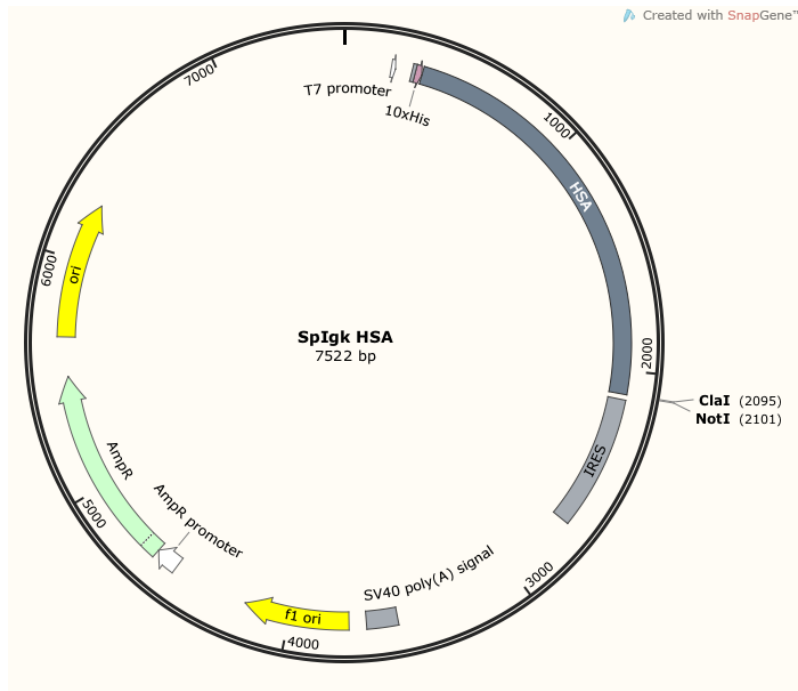


Abbildung 25: Plasmidkarte des Vektors SpIgkHSA zur Produktion von HSA-Fusionsproteinen in 293T HEK-Zellen. Die DNA-Sequenz der humanen hC2-Domäne wurde mithilfe der Restriktionsschnittstellen *ClaI* und *NotI* in den Vektor kloniert. HSA, humanes Serum Albumin; IRES *internal ribosome entry site*; ori, *origin of replication* AmpR, Ampicillin-Resistenzgen.

5.8 Oligonukleotide

Oligonukleotide für die Sequenzierung

Name	Länge	Tm (°C)	Sequenzierung für	Sequenz
153 for	18 nt	53.0	pSW220	AACAATTTACACAGGAG
154 rev	18 nt	63.3	pSW220	GGCTGGCATCAGGAAAAC
202 for	17 nt	56.1	Sequenzierung pSW220 5' von Endotoxin	GATGACGGGTGAAAGTC

Oligonukleotide für die Klonierung der hFVIII-Domänen

Name	Länge	Tm (°C)	PCR	Sequenz
176 for	30 nt	74.8	A2 in pSW220 A2 HindIII	CATCACAAGCTTTCAGTTGCCAAGAA GCAT
177 rev	30 nt	73.4	A2 in pSW220 Xbal	GTGCTCTAGAGCTCTTGGTTCAATGG CATT
178 for	30 nt	76.5	C2 in pSW220 HindIII for	CATCACAAGCTTAGTTGCAGCATGCC ATTG
179 rev	30 nt	75.1	C2 in pSW220 Xbal	GTGCTCTAGAGCGTAGAGGTCCTGTG CCTC
43	27 nt	74.2	C2 in SPIgk-HSA ClaI	GTCATCGATAGTTGCAGCATGCCATT GGGA
56	32 nt	83.2	C2 in SPIgk-HSA NotI	AATGCGGCCGCTCAGTAGAGGTCCTG TGCTC

Oligonukleotide für die Q5® Site directed mutagenesis

Name	Länge	Tm (°C)	PCR	Sequenz
302	19 nt	63.1	pSW220 Deletion frame control fw	GAGCACCATCATCA CCATC
303	18 nt	59.2	pSW220 Deletion frame control rev	AGTGTGATGGTGAT GATG

5.9 Proteine und Enzyme

Name	Beschreibung/Herkunft
Alkaline Phosphatase	<i>Calf intestinal</i> (NEB)
<i>Cla</i> I	Restriktionsenzym (NEB)
FVIII	humaner rekombinanter FVIII, Kogenate® (Bayer HealthCare) oder B-Domänen-freier FVIII Refacto® (Pfizer)
GeneRuler™ 1kb Ladder	TS
<i>Hind</i> III	Restriktionsenzym (NEB)
<i>Not</i> I	Restriktionsenzym (NEB)
PageRuler™ PlusPrestained Protein Ladder	TS
Phusion® Polymerase	<i>high fidelity DNA polymerase</i> (NEB)
<i>Xba</i> I	Restriktionsenzym (NEB)

5.10 Antikörper

Primär- und Sekundärantikörper. Für genauere Beschreibung siehe auch 2.3.11.1.

Name/Spezifität	Herkunft
anti-CD79a	Maus, monoklonal (ABD Serotec)
anti-ETA	Kaninchen, polyklonal (VWR)
anti-FLAG M1	Maus, monoklonal (SIA)
anti-FLAG M2 HRP	Maus, monoklonal (SIA)
anti-human HRP	Ziege, polyklonal (Invitrogen)

anti-Kaninchen HRP	Ziege, polyklonal (Dianova, Jackson)
anti-Maus HRP	Ratte, polyklonal (Dianova, Jackson)
anti-Maus HRP	Ziege, polyklonal (Dianova, Jackson)
anti-Maus PE	Ziege, polyklonal (BioLegend)
BO2C11	human, monoklonal (Marc Jacquemin, Zentrum für molekulare und vaskuläre Biologie, Universität Leuven, Belgien)
ESH8	Maus, monoklonal (SD)
GMA 012	Maus, monoklonal (GMA)
GMA 8003	Maus, monoklonal (GMA)
GMA 8006	Maus, monoklonal (GMA)
GMA 8008	Maus, monoklonal (GMA)
GMA 8009	Maus, monoklonal (GMA)
GMA 8011	Maus, monoklonal (GMA)
GMA 8014	Maus, monoklonal (GMA)
GMA 8015	Maus, monoklonal (GMA)
GMA 8017	Maus, monoklonal (GMA)
GMA 8021	Maus, monoklonal (GMA)
LE2E9	Mensch, monoklonal (Marc Jacquemin, Zentrum für molekulare und vaskuläre Biologie, Universität Leuven, Belgien)

5.11 Kits

Name	Herkunft
Amersham ECL Prime Western Blotting	GE Healthcare

Detection Reagent	
NucleoBond PC500 Plasmid DNA Preparation Kit	Macherey-Nagel
peqGOLD Cycle-Pure Kit (Classic-Line)	VWR
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I	VWR
Pierce LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit	Thermo Fisher Scientific (TS)
Q5® site directed mutagenesis Kit	NEB
Quick Ligation™ Kit	NEB

5.12 Chemikalien

Name	Beschreibung (Herkunft)
AEC	3-Amino-9-ethylcarbazole (BD)
Agar	Agar Agar, Kobe I (CR)
Ampicillin-Natriumsalz	CR
APS	Ammoniumpersulfat (SIA)
Bromphenol-Natriumsalz	(AppliChem)
BSA	Bovines Serum Albumin (SIA)
Dimethylformamid	DMF (J.T. Baker)
Dinatriumhydrogenphosphat	Na ₂ HPO ₄ (AppliCem)
DMSO	CR
Essigsäure	CH ₃ COOH (SIA)
Ethanol	100%-Lösung, vergällt (SIA)

Ethylendiamintetraessigsäure	EDTA (AppliChem)
EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotin	Biotinylierungsreagenz (TF)
Glycerin	CR
H ₂ O ₂	30 %-Wasserstoffperoxidlösung (CR)
Imidazol	AppliChem
Isopropanol	99.5 %-Lösung (Fluka)
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid	IPTG (CR)
Kalziumchlorid-Dihydrat	CaCl ₂ *H ₂ O (AppliChem)
MES	CR
Methanol	99.8%-Lösung (SIA)
Milchpulver	Skim Milk Powder (SIA)
MTT-Formazan	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide) Tetrazoliumblau (SIA)
Natriumacetat	C ₂ H ₃ NaO ₂ , (AppliChem)
Natriumchlorid	NaCl (SIA)
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O (Merck)
Natriumhydroxid	NaOH, 45 %-Lösung
Natriumlaurylsulfat	SDS (CR)
Salzsäure	2M HCl (AppliChem)
TEMED	Tetramethylethylendiamin (CR)
Tetrazyklin-Base	AppliChem
Tris-Hydrochlorid	Tris-HCl (SIA)

Trypanblau	AppliChem
Tween20®	CR
β-Mercaptoethanol	AppliChem

5.13 Geräte und Software

Name	Hersteller
FACSCanto™ 10	BD Biosciences
FlowJo, LLC	BD Biosciences
ÄKTAprime Plus	GE Healthcare
Biofuge Fresco	Heraeus
Biofuge Fresco 17	Heraeus
Biofuge primo R	Heraeus
ChemiDoc XRS+ Imaging System	BioRad
CO ₂ Inkubator Typ BB 16 CU	Heraeus
CO8000 Photometer	Biochrom
Digitaler Heizblock	VWR
EliAnalyse V 6.1	AELVIS
ELIScan	AELVIS
ELx405 Mikrotiterplattenwascher	BioTek
Galaxy Mini Tischzentrifuge	VWR
Gene Amp® PCR System 9700	Applied Biosystems
GraphPad Prism	GraphPad Software Inc
IKAMAG® RET Magnetrührer	IKA Works

Image Lab™	BioRad
Infrarotlampe 100 W Sanitas SIL06	Hans Dinslage GmbH
Inkubator Typ B12	Heraeus
Lab-860 pH Meter	SO Analytics
MACSmix™ Rotator	Miltenyi Biotec
Mehrkanalpipette 30-300 µl	Eppendorf
Microskop Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss AG
Mini Trans-Blot® Cell	BioRad
Mini-PROTEAN® Tetra Cell Elektrophoresesystem	Biorad
Multifuge 1 S-R	Heraeus
Multipipette® Stream	Eppendorf
NanoDrop 1000	Thermo Fisher Scientific
pH Elektrode BlueLine	Schott
Pipetten Research® 0.2-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl	Eppendorf
Pipetierhilfe Pipetboy® acu	Integra Biosciences
PowerPac™ Stromversorgung	BioRad
REGLO Digital Peristaltikpumpe	ISMATEC
Schüttler SM-30 mit Inkubationskammer TH 30	Edmund Bühler
Sonifier 250/450	Emerson Electric Company, MO, USA
Tecan Sunrise™ Mikrotiterplattenleser	Tecan Group Ltd.
UNICORN PrimeView 5.0	GE Healthcare

Universal U4800P Waage	Sartorius
Vortex-Genie 2	VWR

5.14 Plastikwaren und andere Materialien

Name	Herkunft
Falcon® Polystyrene <i>round-bottom tubes</i> , 5ml	BD
6-well Zellkulturplatten, Suspension	Sarstedt
96-well Mikrotiterplatten Microlon 600	Greiner
96-well Zellkulturplatten, Suspension	Sarstedt
Agarschalen, 10 cm	Sarstedt
C-Chip Neubauer Einweg Zellzählkammer Hemocytometer	Biochrom
Corning® Zellsieb, 70 µm	BD
Duran® Erlenmeyerkolben, 100 ml, 500 ml, 2000 ml	Schott
Einweg-UV-Küvetten, halbmikro	Brand
<i>EliFoil</i> 2 Klebefolien für ELISPOT-Membranen	AELVIS
Falcon® <i>round bottom snap caps</i> , 15 ml	BD
Falcon® Zentrifugenröhrchen, konisch, 15 ml, 50 ml	BD
Fiberpads	SIA
Grafco® Silbernitrat Ätzstifte	Graham-Field

Greiner® BioOne Zellkulturflaschen	CR
HisTrap HP-Säulen, 1ml	GE Healthcare
HiTrap SP FF Säulen, 1ml	GE Healthcare
Mediware® Einmalskalpelle	Servopax
Microlance Kanülen	BD
Microlance Plastipak™ Spritzen	BD
Mini-PROTEAN® Tetra Handcast System	BioRad
NALGENE™ Mehrweg-Flaschenaufsatz zum Filtrieren	Nalge Company
SealPlate® Verschießfolien	Excel Scientific
Serologische Pipetten, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Sarstedt, BD
SnakeSkin™ Dialyseschlauch, 22 mm, MWCO 10 kDa	TS
TipOne® Filterspitzen 20, 200, 1000 µl	Starlab
Vivaspin 20 Konzentratoren (MWCO 10 kDa)	GE Healthcare
Whatman® Filterpaper	SIA
Zellkulturschalen, 10 cm	Greiner
Celluloseacetatfilter, 0.2 µm	Sartorius
GenePulser® Einwegelektroporationsküvetten, 0.2 cm	BioRad
Multiply 0.2 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt
Pierce™ High Capacity Endotoxin	TS

Removal Spin Columns, 0.5 mL	
Zeba™ <i>Desalting Spin Columns, 2.5 ml</i>	TS
Biosphere Filterspitzen 0.5-20 µl	Sarstedt
Nunc Kryogefäße, 1.8 ml	Nalge Company
Millex-GS Spritzenfilter, 0.22 µm	Millipore
96-well <i>Multiscreen-IP</i> Filterplatten, 0.45 µm	Millipore
Trans-Blot® Transfer Medium, 0.45 µm Nitrocellulosemembran	Biorad
SafeSeal® Reaktionsgefäße 1.5, 2.0 ml	Sarstedt

6 Anhang

Tabelle 4: Eigenschaften und Epitopspezifität monoklonaler muriner anti-hA2-Antikörper (adaptiert aus Markovitz *et al.*¹⁰⁷). Dargestellt sind Namen der monoklonalen Antikörper (mAbs), Inhibitortiter (BU/mg IgG), Inhibitor-Kinetik (Typ), muriner Isotyp, Epitopspezifität und Gruppenzugehörigkeit.*nicht anwendbar auf nicht-inhibitorische Antikörper; † nicht bestimmbar (*Indeterminate*).

Nr.	mAbs	BU/mg IgG	Typ	Isotyp	Gruppe	Epitop
1	4A4	40 000	I	IgG2ak	A	Asp403-His444
2	2-76	38 000	I	IgG2ak	A	Arg484-Ile508
3	G32	3 000	I	IgG2ak	A	His444-Ile508
4	I62	15 000	I	IgG2ak	A	Arg484-Ile508
5	I155	40 000	I	IgG1k	A	Arg484-Ile508
6	I160	20 000	I	IgG2ak	A	Arg484-Ile508
7	413	21 000	I	IgG1k	A	Arg484-Ile508
8	G119	10 000	I	IgG1k	A	Arg484-Ile508
9	2-105	40 000	I	IgG1k	A	Arg484-Ile508
10	B157	<1	N/A*	IgG1k	AB	Indeterminate
11	2-93	4	II	IgG1k	B	Arg541-Glu604
12	B107	Indeterminate†	II	IgG2ak	B	Arg541-Glu604
13	4F4	330	I	IgG2ak	B	Indeterminate
14	G139	<1	N/A*	IgG1k	B	Arg541-Glu604
15	B94	Indeterminate†	II	IgG1k	B	Arg541-Glu604
16	G6	NI	N/A*	IgG2ak	B	His444-Ile508
17	G4	9	I	IgG1k	B	Arg541-Glu604
18	B99	11	I	IgG1k	BCD	Indeterminate
19	G48	5	II	IgG2ak	C	His444-Arg541
20	B25	100	I	IgG1k	C	His444-Gln468
21	2-54	34 000	II	IgG1k	D	Glu604-Arg740

22	CLB-CAg 9	Indeterminate†	II	IgG1κ	D	Glu604-Arg740
23	GMA-012	<1	N/A*	IgG1κ	D	Glu604-Arg740
24	G74	1 500	I	IgG1κ	DE	Glu604-Arg740
25	1D4	7 000	I	IgG2ακ	E	Glu604-Arg740
26	B66	4 000	I	IgG2ακ	E	Glu604-Arg740
27	B161	150	I	IgG2ακ	E	Glu604-Arg740
28	4C7	<1	N/A*	IgG2ακ	E	Indeterminate
29	2G10	Indeterminate†	II	IgG2ακ	E	Indeterminate

Tabelle 5: Eigenschaften monoklonaler anti-hC2-Antikörper (adaptiert aus Meeks *et al.*¹¹¹). Bis auf BO2C11 sind alle Antikörper murinen Ursprungs. Dargestellt sind Namen der monoklonalen Antikörper (mAbs), muriner Isotyp, Gruppenzugehörigkeit, Inhibitortiter (BU/mg IgG) und Inhibitor-Kinetik (Typ), Gruppenzugehörigkeit; nicht bestimmbar (*Indeterminate*).

Nr.	mAb	Isotyp	Gruppe	BU/mg	Typ
1	3E6	IgG2ακ	A	41	I
2	I54	IgG2βκ	A	1 300	I
3	ESH4	IgG2α	A	39	II
4	F85	IgG1κ	AB	6	II
5	F100	IgG1κ	AB	5	II
6	F137	IgG2ακ	AB	6	Indeterminate
7	I89	IgG2ακ	AB	1 900	I
8	I117	IgG2ακ	AB	1 800	I
9	I109	IgG1κ	AB	1 500	I
10	BO2C11	IgG4	AB	20 000	I
11	1B5	IgG2ακ	B	930	II
12	3C6	IgG2ακ	B	71	Indeterminate

13	3D12	IgG2bk	B	2 600	I
14	D102	IgG2ak	B	3 800	I
15	3G6	IgG2bk	BC	25 000	II
16	2-77	IgG2ak	BC	25 000	II
17	B45	IgG2bk	BC	21 000	II
18	B9	IgG2ak	BC	31 000	II
19	B11	IgG1k	BC	3 300	II
20	B75	IgG2ak	BC	IND	II
21	D105	IgG1k	BC	0.8	II
22	F77	IgG2bk	BC	26 000	II
23	F178	IgG1k	BC	18 000	II
24	F67	IgG2bk	BC	21 000	II
25	G99	IgG2ak	BC	15 000	II
26	G86	IgG2ak	BC	4 300	II
27	I14	IgG2ak	BC	44 000	II
28	I55	IgG1k	BC	10 000	II
29	2-117	IgG2ak	C	>0.4	II
30	ESH8	IgG2a	C	10 000	II

7 Quellen

1. Monroe, D. M., Hoffman, M. & Roberts, H. R. Transmission of a procoagulant signal from tissue factor-bearing cell to platelets. *Blood Coagul. Fibrinolysis* **7**, 459–464 (1996).
2. Hoffman, M. Remodeling the blood coagulation cascade. *J. Thromb. Thrombolysis* **16**, 17–20 (2003).
3. Hoffman, M. & Monroe, D. M. A cell-based model of hemostasis. *Thromb. Haemost.* **85**, 958–965 (2001).
4. Bishop, P. & Lawson, J. Recombinant biologics for treatment of bleeding disorders. *Nat Rev Drug Discov* **3**, 684–694 (2004).
5. Lenting, P. J., van Mourik, J. A. & Mertens, K. The life cycle of coagulation factor VIII in view of its structure and function. *Blood* **92**, 3983–3996 (1998).
6. Dorner, A. J., Bole, D. G. & Kaufman, R. J. The relationship of N-linked glycosylation and heavy chain-binding protein association with the secretion of glycoproteins. *J. Cell Biol.* **105**, 2665–2674 (1987).
7. Pittman, D. D. *et al.* Biochemical, immunological, and in vivo functional characterization of B-domain-deleted factor VIII. *Blood* **81**, 2925–2935 (1993).
8. Pipe, S. W. Functional roles of the factor VIII B domain. *Haemophilia* **15**, 1187–1196 (2009).
9. Bihoreau, N., Pin, S., de Kersabiec, A. M., Vidot, F. & Fontaine-Aupart, M. P. Copper-atom identification in the active and inactive forms of plasma-derived FVIII and recombinant FVIII-delta II. *Eur. J. Biochem.* **222**, 41–48 (1994).
10. Toole, J. J. *et al.* A large region (approximately equal to 95 kDa) of human factor VIII is dispensable for in vitro procoagulant activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 5939–5942 (1986).
11. Foster, P. A., Fulcher, C. A., Marti, T., Titani, K. & Zimmerman, T. S. A major factor VIII binding domain resides within the amino-terminal 272 amino acid residues of von Willebrand factor. *Journal of Biological Chemistry* **262**, 8443–8446 (1987).
12. Tuddenham, E. G. *et al.* Response to infusions of polyelectrolyte fractionated human factor VIII concentrate in human haemophilia A and von Willebrand's disease. *British Journal of Haematology* **52**, 259–267 (1982).
13. Weiss, H. J., Sussman, I. I. & Hoyer, L. W. Stabilization of factor VIII in plasma by the von Willebrand factor. Studies on posttransfusion and dissociated factor VIII and in patients with von Willebrand's disease. *J. Clin. Invest.* **60**, 390–404 (1977).
14. Saenko, E. L. & Scandella, D. The acidic region of the factor VIII light chain and the C2 domain together form the high affinity binding site for von willebrand factor. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 18007–18014 (1997).
15. Leyte, A., Verbeet, M. P. & Brodniewicz-Proba, T. The interaction between human blood-coagulation factor VIII and von Willebrand factor. Characterization of a high-affinity binding site on factor VIII. *Biochem J* **57**, 679–683 (1989).
16. Shima, M. *et al.* A factor VIII neutralizing monoclonal antibody and a human inhibitor alloantibody recognizing epitopes in the C2 domain inhibit factor VIII binding to von Willebrand factor and to phosphatidylserine. *Thromb. Haemost.* **69**, 240–246 (1993).
17. Jacquemin, M. *et al.* A human antibody directed to the factor VIII C1 domain

- inhibits factor VIII cofactor activity and binding to von Willebrand factor. *Blood* **95**, 156–163 (2000).
18. Lenting, P. J., Donath, M. J., van Mourik, J. A. & Mertens, K. Identification of a binding site for blood coagulation factor IXa on the light chain of human factor VIII. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 7150–7155 (1994).
 19. Fay, P. J., Mastro, M., Koszelak, M. E. & Wakabayashi, H. Cleavage of factor VIII heavy chain is required for the functional interaction of a2 subunit with factor IXA. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 12434–12439 (2001).
 20. Lollar, P., Hill-Eubanks, D. C. & Parker, C. G. Association of the factor VIII light chain with von Willebrand factor. *Journal of Biological Chemistry* **263**, 10451–10455 (1988).
 21. Regan, L. M. & Fay, P. J. Cleavage of factor VIII light chain is required for maximal generation of factor VIIIa activity. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 8546–8552 (1995).
 22. Donath, M. S., Lenting, P. J., van Mourik, J. A. & Mertens, K. The role of cleavage of the light chain at positions Arg1689 or Arg1721 in subunit interaction and activation of human blood coagulation factor VIII. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 3648–3655 (1995).
 23. Li, X. & Gabriel, D. A. The physical exchange of factor VIII (FVIII) between von Willebrand factor and activated platelets and the effect of the FVIII B-domain on platelet binding. *Biochemistry* **36**, 10760–10767 (1997).
 24. Schmidt, A. E. & Bajaj, S. P. Structure–function relationships in factor IX and factor IXa. *Trends in cardiovascular medicine* **13**, 39–45 (2003).
 25. Ngo, J., Huang, M., Roth, D. A., Furie, B. C. & Furie, B. Crystal structure of human factor VIII: implications for the formation of the factor IXa-factor VIIIa complex. *Structure* **16**, 597–606 (2008).
 26. Barrow, R. T., Healey, J. F., Jacquemin, M. G., Saint-Remy, J. M. & Lollar, P. Antigenicity of putative phospholipid membrane-binding residues in factor VIII. *Blood* **97**, 169–174 (2001).
 27. Lenting, P. J., van de Loo, J. W., Donath, M. J., van Mourik, J. A. & Mertens, K. The sequence Glu1811-Lys1818 of human blood coagulation factor VIII comprises a binding site for activated factor IX. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 1935–1940 (1996).
 28. Fay, P. J. & Scandella, D. Human inhibitor antibodies specific for the factor VIII A2 domain disrupt the interaction between the subunit and factor IXa. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 29826–29830 (1999).
 29. Fay, P. J., Haidaris, P. J. & Smudzin, T. M. Human factor VIIIa subunit structure. Reconstruction of factor VIIIa from the isolated A1/A3-C1-C2 dimer and A2 subunit. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 8957–8962 (1991).
 30. Lollar, P. & Parker, C. G. pH-dependent denaturation of thrombin-activated porcine factor VIII. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 1688–92 (1990).
 31. Fay, P. J., Smudzin, T. M. & Walker, F. J. Activated protein C-catalyzed inactivation of human factor VIII and factor VIIIa. Identification of cleavage sites and correlation of proteolysis with cofactor activity. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 20139–20145 (1991).
 32. Gale, A. J., Cramer, T. J., Rozenshteyn, D. & Cruz, J. R. Detailed mechanisms of the inactivation of factor VIIIa by activated protein C in the presence of its cofactors, protein S and factor V. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 16355–16362 (2008).

33. Jones, P. K. & Ratnoff, O. D. The changing prognosis of classic hemophilia (factor VIII 'deficiency'). *Ann. Intern. Med.* **114**, 641–648 (1991).
34. White, G. C., Rosendaal, F. & Aledort, L. M. Definitions in hemophilia. *Thrombosis and Haemostasis* **85**, 560 (2001).
35. Konkle, B. A., Huston, H. & Fletcher, S. N. Hemophilia A. Novel approach to genetic analysis and results in 3000 hemophilia patients enrolled in the My Life, Our Future initiative. *Blood Adv.* **13**, 824–834 (2017).
36. Oldenburg, J., Ananyeva, N. M. & Saenko, E. L. Molecular basis of haemophilia A. *Haemophilia* **29**, 23–30 (2014)
37. Lakich, D., Kazazian, H. H., Antonarakis, S. E. & Gitschier, J. Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. *Nat. Genet.* **5**, 236–241 (1993).
38. Herrmann, F. H. & Wulff, K. [Factors VII, VIII, IX, and X: molecular genetics and gene diagnosis]. *Hamostaseologie* **24**, 94–107 (2004).
39. Berntorp, E. & Shapiro, A. D. Modern haemophilia care. *Lancet* **379**, 1447–1456 (2012).
40. Hoyer, L. W. Hemophilia a. *N Engl J Med* **330**, 38–47 (1994).
41. Hoots, W. K. Pathogenesis of hemophilic arthropathy. *Semin Hematol* **6**, 63 (2006).
42. Blom, I. *et al.* Prognosis of haemorrhagic stroke in childhood: a long-term follow-up study. *Dev Med Child Neurol* **45**, 233–239 (2003).
43. Bladen, M., Khair, K., Liesner, R. & Main, E. Long-term consequences of intracranial haemorrhage in children with haemophilia. *Haemophilia* **15**, 184–192 (2009).
44. Ljung, R. C. R. Intracranial haemorrhage in haemophilia A and B. *British Journal of Haematology* **140**, 378–384 (2008).
45. Mannucci, P. M. Back to the future: a recent history of haemophilia treatment. *Haemophilia* **14**, 10–18 (2008).
46. Mannucci, P. M. Hemophilia: treatment options in the twenty-first century. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **7**, 1349–55 (2003).
47. White, G. C., McMillan, C. W., Kingdon, H. S. & Shoemaker, C. B. Use of recombinant antihemophilic factor in the treatment of two patients with classic hemophilia. *N Engl J Med* **320**, 166–170 (1989).
48. Franchini, M. & Mannucci, P. M. Hemophilia A in the third millennium. *Blood Rev* **27**, 179–184 (2013).
49. Franchini, M. The use of desmopressin as a hemostatic agent: a concise review. *American Journal of Hematology* **82**, 731–5 (2007).
50. Hay, C., Palmer, B., Chalmers, E. & Liesner, R. Incidence of factor VIII inhibitors throughout life in severe hemophilia A in the United Kingdom. *Blood* **117**, 6367–70 (2011).
51. Iorio, A. *et al.* Rate of inhibitor development in previously untreated hemophilia A patients treated with plasma-derived or recombinant factor VIII concentrates: a systematic review. *J. Thromb. Haemost.* **8**, 1256–1265 (2010).
52. Eckhardt, C. L. *et al.* Factor VIII gene (F8) mutation and risk of inhibitor development in nonsevere hemophilia A. *Blood* **122**, 1954–1962 (2013).
53. Varon, D., Martinowitz, U., Heim, M. & Hay, C. Factor VIII inhibitors in mild and moderate-severity haemophilia A. *Haemophilia* **4**, 558–63 (1998).
54. Lenting, P. J. *et al.* The light chain of factor VIII comprises a binding site for

- low density lipoprotein receptor-related protein. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 23734–23739 (1999).
55. Saenko, E. L., Yakhyaev, A. V., Mikhailenko, I., Strickland, D. K. & Sarafanov, A. G. Role of the low density lipoprotein-related protein receptor in mediation of factor VIII catabolism. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 37685–37692 (1999).
 56. Dasgupta, S. *et al.* Factor VIII bypasses CD91/LRP for endocytosis by dendritic cells leading to T-cell activation. *Haematologica* **93**, 83–89 (2008).
 57. Repessé, Y. *et al.* Mannose-sensitive receptors mediate the uptake of factor VIII therapeutics by human dendritic cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* **129**, 1172–3– author reply 1174–5 (2012).
 58. Dasgupta, S. *et al.* A role for exposed mannosylations in presentation of human therapeutic self-proteins to CD4+ T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 8965–8970 (2007).
 59. Gangadharan, B. *et al.* The C1 and C2 domains of blood coagulation factor VIII mediate its endocytosis by dendritic cells. *Haematologica* **102**, 271–281 (2017).
 60. Herczenik, E. *et al.* Uptake of blood coagulation factor VIII by dendritic cells is mediated via its C1 domain. *J. Allergy Clin. Immunol.* **129**, 501–9– 509.e1–5 (2012).
 61. Reipert, B. M. *et al.* Modulation of factor VIII-specific memory B cells. *Haemophilia* **16**, 25–34 (2010).
 62. White, G. C., Kempton, C. L., Grimsley, A., NIELSEN, B. & Roberts, H. R. Cellular immune responses in hemophilia: why do inhibitors develop in some, but not all hemophiliacs? *J. Thromb. Haemost.* **3**, 1676–1681 (2005).
 63. Reding, M. T., Wu, H., Krampf, M. & Okita, D. K. CD4+ T cell response to factor VIII in hemophilia A, acquired hemophilia, and healthy subjects. *Thrombosis and Hemostasis ...* **82**, 509–515 (1999).
 64. Reding, M. T. *et al.* Sensitization of CD4+ T cells to coagulation factor VIII: response in congenital and acquired hemophilia patients and in healthy subjects. *Thromb. Haemost.* **84**, 643–652 (2000).
 65. Singer, S. T., Addiego, J. E., Reason, D. C. & Lucas, A. H. T lymphocyte proliferative responses induced by recombinant factor VIII in hemophilia A patients with inhibitors. *Thromb. Haemost.* **76**, 17–22 (1996).
 66. Sousa, C. E. Dendritic cells in a mature age. *Nat. Rev. Immunol.* (2006).
 67. van Kooten, C. & Banchereau, J. Functions of CD40 on B cells, dendritic cells and other cells. *Curr. Opin. Immunol.* **9**, 330–337 (1997).
 68. Scholl, P. R. & Geha, R. S. MHC class II signaling in B-cell activation. *Immunology today* **15**, 418–22 (1994).
 69. McHeyzer-Williams, L. J. & McHeyzer-Williams, M. G. Antigen-specific memory B cell development. *Annual Review of Immunology* **23**, 487–513 (2005).
 70. Murphy, K. & Weaver, C. *Janeway's Immunobiology, 9th edition.* (Garland Science, 2016).
 71. Georgescu, M. T., Lai, J. D., Hough, C. & Lillicrap, D. War and peace: Factor VIII and the adaptive immune response. *Cell. Immunol.* **301**, 2–7 (2016).
 72. Van Helden, P. M. W., van Haren, S. D., Fijnvandraat, K., Marijke van den Berg, H. & Voorberg, J. Factor VIII-specific B cell responses in haemophilia A patients with inhibitors. *Haemophilia* **16**, 35–43 (2008).

73. Avalos, A. M. & Ploegh, H. L. Early BCR Events and Antigen Capture, Processing, and Loading on MHC Class II on B Cells. *Front Immunol* **5**, 92 (2014).
74. Caballero, A. *et al.* Functional and structural requirements for the internalization of distinct BCR-ligand complexes. *Eur. J. Immunol.* **36**, 3131–3145 (2006).
75. Putnam, M. A. *et al.* Lipid raft-independent B cell receptor-mediated antigen internalization and intracellular trafficking. *J Immunol* **170**, 905–912 (2003).
76. Salisbury, J. L., Condeelis, J. S. & Satir, P. Role of coated vesicles, microfilaments, and calmodulin in receptor-mediated endocytosis by cultured B lymphoblastoid cells. *J. Cell Biol.* **87**, 132–141 (1980).
77. Tiede, A., Klamroth, R., Scharf, R. E. & Trappe, R. U. Prognostic factors for remission of and survival in acquired hemophilia A (AHA): results from the GTH-AH 01/2010 study. *Blood* **125**, 1091-7 (2015).
78. Knoebl, P. *et al.* Demographic and clinical data in acquired hemophilia A: results from the European Acquired Haemophilia Registry (EACH2). *J. Thromb. Haemost.* **10**, 622–631 (2012).
79. Baudo, F. *et al.* Management of bleeding in acquired hemophilia A: results from the European Acquired Haemophilia (EACH2) Registry. *Blood* **120**, 39–46 (2012).
80. Kruse-Jarres, R. *et al.* Acquired hemophilia A: Updated review of evidence and treatment guidance. *American Journal of Hematology* **92**, 695–705 (2017).
81. Jarres, R. K., Louis, J. S., Greist, A. & Shapiro, A. Efficacy and safety of OBI-1, an antihaemophilic factor VIII (recombinant), porcine sequence, in subjects with acquired haemophilia A. **2**, 162-70 (2015).
82. Collins, P. W. Management of acquired haemophilia A. *J. Thromb. Haemost.* **9 Suppl 1**, 226–235 (2011).
83. Knoebl, P. *et al.* Demographic and clinical data in acquired hemophilia A: results from the European Acquired Haemophilia Registry (EACH2). *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **10**, 622–631 (2012).
84. Kasper, C. K. & Pool, J. G. Letter: Measurement of mild factor VIII inhibitors in Bethesda units. *Thromb Diath Haemorrh* **34**, 875–876 (1975).
85. White, G. C. *et al.* Definitions in hemophilia. Recommendation of the scientific subcommittee on factor VIII and factor IX of the scientific and standardization committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thrombosis and haemostasis* **85**, 560 (2001).
86. Reding, M. T. *et al.* Distribution of Th1- and Th2-induced anti-factor VIII IgG subclasses in congenital and acquired hemophilia patients. *Thromb. Haemost.* **88**, 568–575 (2002).
87. Whelan, S. F. J. *et al.* Distinct characteristics of antibody responses against factor VIII in healthy individuals and in different cohorts of hemophilia A patients. *Blood* **121**, 1039–1048 (2013).
88. Hofbauer, C. J. *et al.* Affinity of FVIII-specific antibodies reveals major differences between neutralizing and non-neutralizing antibodies. *Blood* **2**, 162-70 (2014).
89. Rispens, T., Ooijevaar-de Heer, P., Bende, O. & Aalberse, R. C. Mechanism of immunoglobulin G4 Fab-arm exchange. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 10302–10311 (2011).

90. Lacroix-Desmazes, S. *et al.* Catalytic activity of antibodies against factor VIII in patients with hemophilia A. *Nat. Med.* **5**, 1044–1047 (1999).
91. Hu, G.-L., Okita, D. K., Diethelm-Okita, B. M. & Conti-Fine, B. M. Recognition of coagulation factor VIII by CD4+ T cells of healthy humans. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **1**, 2159–2166 (2003).
92. Moreau, A., Lacroix-Desmazes, S., Stieltjes, N. & Saenko, E. Antibodies to the FVIII light chain that neutralize FVIII procoagulant activity are present in plasma of nonresponder patients with severe hemophilia A and in normal polyclonal human IgG. *Blood* **95**, 3435-41 (2000).
93. Gilles, J. G. & Saint-Remy, J. M. Healthy subjects produce both anti-factor VIII and specific anti-idiotypic antibodies. *J. Clin. Invest.* **94**, 1496–1505 (1994).
94. Batlle, J. *et al.* Antibodies to factor VIII in plasma of patients with hemophilia A and normal subjects. *Ann. Hematol.* **72**, 321–326 (1996).
95. Jacquemin, M. G. & Saint-Remy, J.-M. R. Factor VIII alloantibodies in hemophilia. *Curr. Opin. Hematol.* **11**, 146–150 (2004).
96. Barrow, R. T., Healey, J. F., Gailani, D., Scandella, D. & Lollar, P. Reduction of the antigenicity of factor VIII toward complex inhibitory antibody plasmas using multiply-substituted hybrid human/porcine factor VIII molecules. *Blood* **95**, 564–568 (2000).
97. Ananyeva, N. M. *et al.* Inhibitors in hemophilia A: mechanisms of inhibition, management and perspectives. *Blood Coagul. Fibrinolysis* **15**, 109–124 (2004).
98. Pratt, K. P. *et al.* Immunodominant T-cell epitopes in the factor VIII C2 domain are located within an inhibitory antibody binding site. *Thromb. Haemost.* **92**, 522–528 (2004).
99. Pratt, K. P. Engineering less immunogenic and antigenic FVIII proteins. *Cell. Immunol.* **301**, 12-7 (2015).
100. Kallas, A., Pooga, M., Benhida, A., Jacquemin, M. & Saint-Remy, J. M. Epitope specificity of anti-FVIII antibodies during immune tolerance therapy with factor VIII preparation containing von Willebrand factor. *Thromb. Res.* **107**, 291–302 (2002).
101. Zakas, P. M., Vanijcharoenkarn, K., Markovitz, R., Meeks, S. L. & Doering, C. B. B-Cell Epitopes Within The A2 and C2 Domains Of Coagulant Factor VIII Refined By Orthologous Protein Antigenicity. *Blood* **122**, 1101–1101 (2013).
102. Zakas, P. M., Vanijcharoenkarn, K., Markovitz, R. C., Meeks, S. L. & Doering, C. B. Expanding the ortholog approach for hemophilia treatment complicated by factor VIII inhibitors. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **13**, 72–81 (2014).
103. Healey, J. F. *et al.* The humoral response to human factor VIII in hemophilia A mice. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **5**, 512–519 (2007).
104. Kahle, J. *et al.* Frequency and epitope specificity of anti-factor VIII C1 domain antibodies in acquired and congenital hemophilia A. **30**, 808-816 *Blood* (2017).
105. Lollar, P., Parker, E. T. & Curtis, J. E. Inhibition of human factor VIIIa by anti-A2 subunit antibodies. *Journal of Clinical* **93**, 2497-504 (1994).
106. Fay, P. J., Beattie, T., Huggins, C. F. & Regan, L. M. Factor VIIIa A2 subunit residues 558-565 represent a factor IXa interactive site. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 20522–20527 (1994).

107. Markovitz, R. C., Healey, J. F., Parker, E. T., Meeks, S. L. & Lollar, P. The diversity of the immune response to the A2 domain of human factor VIII. *Blood* **121**, 2785–2795 (2013).
108. Scandella, D., Timmons, L., Mattingly, M., Trabold, N. & Hoyer, L. W. A soluble recombinant factor VIII fragment containing the A2 domain binds to some human anti-factor VIII antibodies that are not detected by immunoblotting. *Thromb. Haemost.* **67**, 665–671 (1992).
109. Eubanks, J. *et al.* A subset of high-titer anti-factor VIII A2 domain antibodies is responsive to treatment with factor VIII. *Blood* **127**, 2028–2034 (2016).
110. Healey, J. F. *et al.* Residues 484-508 Contain a Major Determinant of the Inhibitory Epitope in the A2 Domain of Human Factor VIII. *J. Biol. Chem.* **270**, 14505–14509 (1995).
111. Meeks, S. L., Healey, J. F., Parker, E. T., Barrow, R. T. & Lollar, P. Antihuman factor VIII C2 domain antibodies in hemophilia A mice recognize a functionally complex continuous spectrum of epitopes dominated by inhibitors of factor VIII activation. *Blood* **110**, 4234–4242 (2007).
112. Meeks, S. L., Healey, J. F., Parker, E. T., Barrow, R. T. & Lollar, P. Nonclassical anti-C2 domain antibodies are present in patients with factor VIII inhibitors. *Blood* **112**, 1151–1153 (2008).
113. Gouw, S. C. *et al.* F8 gene mutation type and inhibitor development in patients with severe hemophilia A: systematic review and meta-analysis. *Blood* **119**, 2922–2934 (2012).
114. Oldenburg, J. *et al.* Environmental and genetic factors influencing inhibitor development. *Semin Hematol* **41**, 82–88 (2004).
115. Schwaab, R. *et al.* Haemophilia A: mutation type determines risk of inhibitor formation. *Thromb. Haemost.* **74**, 1402–1406 (1995).
116. Oldenburg, J. & Pavlova, A. Genetic risk factors for inhibitors to factors VIII and IX. *Haemophilia* **12**, 15–22 (2006).
117. Goodeve, A. The incidence of inhibitor development according to specific mutations--and treatment? *Blood Coagul. Fibrinolysis* **14 Suppl 1**, S17–21 (2003).
118. Oldenburg, J., Picard, J. K. & Schwaab, R. HLA genotype of patients with severe haemophilia A due to intron 22 inversion with and without inhibitors of factor VIII. **93**, 2497-504 *Thrombosis and Hemostasis* (1997).
119. Hay, C. R. *et al.* HLA class II profile: a weak determinant of factor VIII inhibitor development in severe haemophilia A. UKHCDO Inhibitor Working Party. *Thromb. Haemost.* **77**, 234–237 (1997).
120. Astermark, J. *et al.* Polymorphisms in the IL10 but not in the IL1beta and IL4 genes are associated with inhibitor development in patients with hemophilia A. *Blood* **107**, 3167–3172 (2006).
121. Astermark, J. *et al.* Polymorphisms in the TNFA gene and the risk of inhibitor development in patients with hemophilia A. *Blood* **108**, 3739–3745 (2006).
122. Astermark, J., Wang, X. & Oldenburg, J. Polymorphisms in the CTLA-4 gene and inhibitor development in patients with severe hemophilia A. *Journal of Thrombosis and Hemostasis* **5**, 263-5 (2007).
123. Miller, C. H. *et al.* F8 and F9 mutations in US haemophilia patients: correlation with history of inhibitor and race/ethnicity. *Haemophilia* **18**, 375–382 (2012).
124. Goudemand, J. *et al.* Influence of the type of factor VIII concentrate on the

- incidence of factor VIII inhibitors in previously untreated patients with severe hemophilia A. *Blood* **107**, 46–51 (2006).
125. Ragni, M. V. *et al.* Risk factors for inhibitor formation in haemophilia: a prevalent case-control study. *Haemophilia* **15**, 1074–1082 (2009).
 126. Maclean, P. S. *et al.* Treatment related factors and inhibitor development in children with severe haemophilia A. *Haemophilia* **17**, 282–287 (2011).
 127. Gouw, S. C., van der Bom, J. G. & Marijke van den Berg, H. Treatment-related risk factors of inhibitor development in previously untreated patients with hemophilia A: the CANAL cohort study. *Blood* **109**, 4648–4654 (2007).
 128. Matzinger, P. The evolution of the danger theory. *Expert Review of Clinical Immunology* **8**, 311–317 (2014).
 129. Franchini, M., Tagliaferri, A. & Mengoli, C. Cumulative inhibitor incidence in previously untreated patients with severe hemophilia A treated with plasma-derived versus recombinant factor VIII concentrates *Critical reviews in Oncology and Hematology* **81**, 82-93 (2012).
 130. Mannucci, P. M., Mancuso, M. E. & Santagostino, E. How we choose factor VIII to treat hemophilia. *Blood* **119**, 4108–4114 (2012).
 131. Lai, J., Hough, C., Tarrant, J. & Lillicrap, D. Biological considerations of plasma-derived and recombinant factor VIII immunogenicity. *Blood* **129**, 3147–3154 (2017).
 132. Witmer, C. & Young, G. Factor VIII inhibitors in hemophilia A: rationale and latest evidence. *Ther Adv Hematol* **4**, 59–72 (2013).
 133. Mauser-Bunschoten, E. P. & Nieuwenhuis, H. K. Low-dose immune tolerance induction in hemophilia A patients with inhibitors. *Blood* (1995).
 134. Brackmann, H. H., Oldenburg, J. & Schwaab, R. Immune tolerance for the treatment of factor VIII inhibitors--twenty years' 'bonn protocol'. *Vox Sang.* **70 Suppl 1**, 30–35 (1996).
 135. Freiburghaus, C. *et al.* Tolerance induction using the Malmö treatment model 1982-1995. *Haemophilia* **5**, 32–39 (1999).
 136. Hay, C. R. M., DiMichele, D. M. International Immune Tolerance Study. The principal results of the International Immune Tolerance Study: a randomized dose comparison. *Blood* **119**, 1335–1344 (2012).
 137. Van Helden, P., Gouw, S., Mauser-Bunschoten, E., Van Den Berg, H. & Voorberg, J. Variation in antibody subclass pattern during immune tolerance therapy: 14 Po 431. *Haemophilia* **12**, (2006).
 138. Gilles, J. G. Role of anti-idiotypic antibodies in immune tolerance induction. *Haemophilia* **16**, 80–83 (2010).
 139. Cao, O. & LODUCA, P. A. Role of regulatory T cells in tolerance to coagulation factors. *Journal of Thrombosis and Hemostasis* **Suppl 1**, 88-91 (2009).
 140. Manz, R. A., Hauser, A. E. & Hiepe, F. Maintenance of serum antibody levels. *Annu Rev Immunol* **23**, 367-86 (2005).
 141. Antun, A. *et al.* Inhibitor recurrence after immune tolerance induction: a multicenter retrospective cohort study. *J. Thromb. Haemost.* **13**, 1980–1988 (2015).
 142. Mannucci, P. M. & Franchini, M. Porcine recombinant factor VIII: an additional weapon to handle anti-factor VIII antibodies. *Blood Transfus* **15**, 365–368 (2017).
 143. Lillicrap, D. *et al.* Porcine recombinant factor VIII (Obizur; OBI-1; BAX801):

- product characteristics and preclinical profile. *Haemophilia* (2015). doi:10.1111/hae.12784
144. Gomez, K. *et al.* Key issues in inhibitor management in patients with haemophilia. *Blood Transfus* **12 Suppl 1**, s319–29 (2014).
 145. Nogami, K. Bispecific antibody mimicking factor VIII. *Thromb. Res.* **141 Suppl 2**, S34–S35 (2016).
 146. VandenDriessche, T. & Chuah, M. K. L. Hemophilia gene therapy: ready for prime time? *Hum. Gene Ther.* **28**, 1013–1023 (2017).
 147. Lei, T. C. Induction of tolerance to factor VIII inhibitors by gene therapy with immunodominant A2 and C2 domains presented by B cells as Ig fusion proteins. *Blood* **105**, 4865–4870 (2005).
 148. Eynon, E. E. & Parker, D. C. Small B cells as antigen-presenting cells in the induction of tolerance to soluble protein antigens. *J. Exp. Med.* **175**, 131–138 (1992).
 149. Schmidt, A. *et al.* Neutralisation of factor VIII inhibitors by anti-idiotypes isolated from phage-displayed libraries. *Thromb. Haemost.* **116**, 32–41 (2016).
 150. Brettschneider, K. *et al.* Functional Analysis of Phage Display Selected Single-Chain Variable Antibody Fragments (scFvs) Specific for Anti-FVIII Antibodies. *Blood* **124**, 1499–1499 (2014).
 151. Ragni, M. V., Wu, W., Liang, X. & Hsieh, C. C. Factor VIII– pulsed dendritic cells reduce anti– factor VIII antibody formation in the hemophilia A mouse model. *Experimental Hematology* **37**, 744–754 (2009).
 152. Su, R.-J. *et al.* Suppression of the immune response to FVIII in hemophilia A mice by transgene modified tolerogenic dendritic cells. *Mol. Ther.* **19**, 1896–1904 (2011).
 153. Sherman, A. *et al.* Suppression of inhibitor formation against FVIII in a murine model of hemophilia A by oral delivery of antigens bioencapsulated in plant cells. *Blood* **124**, 1659–1668 (2014).
 154. Weiner, H. L., da Cunha, A. P., Quintana, F. & Wu, H. Oral tolerance. *Immunol. Rev.* **241**, 241–259 (2011).
 155. Miao, C. H. *et al.* CD4+FOXP3+ regulatory T cells confer long-term regulation of factor VIII-specific immune responses in plasmid-mediated gene therapy-treated hemophilia mice. *Blood* **114**, 4034–4044 (2009).
 156. Kallas, A., Kuuse, S., Maimets, T. & Pooga, M. Naturally occurring CD4+ CD25+ cells in modulating immune response to administered coagulation factor VIII in factor VIII-deficient mice. *Haemophilia* **17**, 143–151 (2011).
 157. Matsui, H. *et al.* A murine model for induction of long-term immunologic tolerance to factor VIII does not require persistent detectable levels of plasma factor VIII and involves contributions from Foxp3+ T regulatory cells. *Blood* **114**, 677–685 (2009).
 158. Yoon, J. *et al.* FVIII-specific human chimeric antigen receptor T-regulatory cells suppress T- and B-cell responses to FVIII. *Blood* **129**, 238–245 (2017).
 159. Hausl, C. *et al.* Preventing restimulation of memory B cells in hemophilia A: a potential new strategy for the treatment of antibody-dependent immune disorders. *Blood* **104**, 115–122 (2004).
 160. Field, J. J., Fenske, T. S. & Blinder, M. A. Rituximab for the treatment of patients with very high-titre acquired factor VIII inhibitors refractory to conventional chemotherapy. *Haemophilia* **12**, 46–50 (2007).

161. Markovitz, R. C. *et al.* Decreasing the Humoral Response to Factor VIII By Targeted Deletion of Factor VIII - Specific B Cells. *Blood* **124**, 238–238 (2014).
162. Siegall, C. B., Chaudhary, V. K., FitzGerald, D. J. & Pastan, I. Functional analysis of domains II, Ib, and III of Pseudomonas exotoxin. *Journal of Biological Chemistry* **264**, 14256–14261 (1989).
163. Ogata, M., Fryling, C. M., Pastan, I. & FitzGerald, D. J. Cell-mediated cleavage of Pseudomonas exotoxin between Arg279 and Gly280 generates the enzymatically active fragment which translocates to the cytosol. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 25396-401(1992).
164. Prior, T. I., FitzGerald, D. J. & Pastan, I. Translocation mediated by domain II of Pseudomonas exotoxin A: transport of barnase into the cytosol. *Biochemistry* **31**, 3555-9 (1992).
165. Iglewski, B. H., Liu, P. V. & Kabat, D. Mechanism of action of Pseudomonas aeruginosa exotoxin A:adenosine diphosphate-ribosylation of mammalian elongation factor 2 in vitro and in vivo. *Infect. Immun.* **15**, 138–144 (1977).
166. Proud, C. G. Peptide-chain elongation in eukaryotes. *Molecular biology reports* **19**, 161-70 (1994).
167. Wolf, P. & Elsasser-Beile, U. Pseudomonas exotoxin A: From virulence factor to anti-cancer agent. *International Journal of Medical Microbiology* **299**, 161–176 (2009).
168. Wels, W. *et al.* Construction, Bacterial Expression and Characterization of a Bifunctional Single–Chain Antibody–Phosphatase Fusion Protein Targeted to the Human ERBB–2 Receptor. *Nature Biotechnology* **10**, 1128–1132 (1992).
169. Mazor, R., Onda, M. & Pastan, I. Immunogenicity of therapeutic recombinant immunotoxins. *Immunol. Rev.* **270**, 152–164 (2016).
170. Altenschmidt, U., Schmidt, M. & Groner, B. Targeted therapy of Schwannoma cells in immunocompetent rats with an erbB 2-specific antibody-toxin. *International journal of Cancer* **73**, 117-24 (1997).
171. Azemar, M. *et al.* Recombinant antibody toxins specific for ErbB2 and EGF receptor inhibit their in vitro growth of human head and neck cancer cells and cause rapid tumor regression in vivo. *Int. J. Cancer* **86**, 269–275 (2000).
172. Kreitman, R. J., Wilson, W. H. & Bergeron, K. Efficacy of the anti-CD22 recombinant immunotoxin BL22 in chemotherapy-resistant hairy-cell leukemia. *New England Journal of Medicine* **345**, 241-7 (2001).
173. Klose, D. *et al.* Novel fusion proteins for the antigen-specific staining and elimination of B cell receptor-positive cell populations demonstrated by a tetanus toxoid fragment C (TTC) model antigen. *BMC Biotechnology* **16**, 18 (2016).
174. Nachreiner, T., Kampmeier, F. & Thepen, T. Depletion of autoreactive B-lymphocytes by a recombinant myelin oligodendrocyte glycoprotein-based immunotoxin. *Journal of Neuroimmunology* **95**, 28-35 (2008).
175. Bi, L. *et al.* Targeted disruption of the mouse factor VIII gene produces a model of haemophilia A. *Nat. Genet.* **10**, 119–121 (1995).
176. Mamat, U. *et al.* Detoxifying Escherichia coli for endotoxin-free production of recombinant proteins. *Microb. Cell Fact.* **14**, 57 (2015).
177. Gorbet, M. B. & Sefton, M. V. Endotoxin: the uninvited guest. *Biomaterials* **34**, 6811-7 (2005).
178. Jacquemin, M. G. *et al.* Mechanism and kinetics of factor VIII inactivation:

- study with an IgG4 monoclonal antibody derived from a hemophilia A patient with inhibitor. *Blood* **92**, 496–506 (1998).
179. Skupsky, J., Zhang, A.-H., Su, Y. & Scott, D. W. A role for thrombin in the initiation of the immune response to therapeutic factor VIII. *Blood* **114**, 4741–4748 (2009).
 180. Spiegel, P. C., Jacquemin, M., Saint-Remy, J. M., Stoddard, B. L. & Pratt, K. P. Structure of a factor VIII C2 domain-immunoglobulin G4kappa Fab complex: identification of an inhibitory antibody epitope on the surface of factor VIII. *Blood* **98**, 13–19 (2001).
 181. Selvaraj, S. R., Scheller, A. N., Miao, H. Z., Kaufman, R. J. & Pipe, S. W. Bioengineering of coagulation factor VIII for efficient expression through elimination of a dispensable disulfide loop. *J. Thromb. Haemost.* **10**, 107–115 (2012).
 182. Price, P. W. *et al.* Engineered cell surface expression of membrane immunoglobulin as a means to identify monoclonal antibody-secreting hybridomas. *Journal of Immunological Methods* **343**, 28–41 (2009).
 183. Qian, J., Borovok, M., Bi, L., Kazazian, H. H. & Hoyer, L. W. Inhibitor antibody development and T cell response to human factor VIII in murine hemophilia A. *Thromb. Haemost.* **81**, 240–244 (1999).
 184. Hausl, C. *et al.* Long-term persistence of anti-factor VIII antibody-secreting cells in hemophilic mice after treatment with human factor VIII. *Thromb. Haemost.* **87**, 840–845 (2002).
 185. Hausl, C. *et al.* High-dose factor VIII inhibits factor VIII-specific memory B cells in hemophilia A with factor VIII inhibitors. *Blood* **106**, 3415–3422 (2005).
 186. Hartholt, R. B. *et al.* Enhanced uptake of blood coagulation factor VIII containing immune complexes by antigen presenting cells. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **26**, 6811–7 (2016).
 187. Batsuli, G. *et al.* Factor VIII C2 Domain Epitopes Recognized By Classical and Non-Classical Anti-C2 Domain Monoclonal Antibodies Help Mediate FVIII Uptake By Dendritic Cells. *Blood* **128**, 3762–3762 (2016).
 188. Wakabayashi, H., Griffiths, A. E. & Fay, P. J. Factor VIII Lacking the C2 Domain Retains Cofactor Activity in Vitro. *J. Biol. Chem.* **285**, 25176–25184 (2010).
 189. Wakabayashi, H., Varfaj, F., Deangelis, J. & Fay, P. J. Generation of enhanced stability factor VIII variants by replacement of charged residues at the A2 domain interface. *Blood* **112**, 2761–2769 (2008).
 190. Novakovic, V. A. *et al.* Membrane-binding properties of the Factor VIII C2 domain. *Biochem. J.* **435**, 187–196 (2011).
 191. Elksne, L. E. & Rasmussen, B. A. Dsb-insensitive expression of CcrA, a metallo-beta-lactamase from *Bacteroides fragilis*, in *Escherichia coli* after amino acid substitution at two cysteine residues within CcrA. *J. Bacteriol* **178**, 4306–4309 (1996).
 192. Novakovic, V. A. *et al.* Membrane-binding properties of the Factor VIII C2 domain. *Biochem. J.* **435**, 187–196 (2011).
 193. Wakabayashi, H., Griffiths, A. E. & Fay, P. J. Increasing Hydrophobicity or Disulfide Bridging at the Factor VIII A1 and C2 Domain Interface Enhances Procofactor Stability. *J. Biol. Chem.* **286**, 25748–25755 (2011).
 194. Chhabra, E. S. *et al.* Evaluation of Enhanced in Vitro Plasma Stability of a Novel Long Acting Recombinant FVIII-Fc-VWF-XTEN Fusion Protein. *Blood*

- 126**, 2279–2279 (2015).
195. Ansong, C. & Fay, P. J. Factor VIII A3 domain residues 1954–1961 represent an A1 domain-interactive site. *Biochemistry* **44**, 8850–8857 (2005).
 196. Ansong, C., Miles, S. M. & Fay, P. J. Factor VIII A1 domain residues 97–105 represent a light chain-interactive site. *Biochemistry* **45**, 13140–13149 (2006).
 197. Ke, N. & Berkmen, M. Production of Disulfide-Bonded Proteins in Escherichia coli. *Curr Protoc Mol Biol* **108**, 16.1B.1–21 (2014).
 198. Singh, S. M. & Panda, A. K. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **99**, 303–310 (2005).
 199. Tsumoto, K., Ejima, D., Kumagai, I. & Arakawa, T. Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expr Purif* **28**, 1–8 (2002).
 200. McKee, M. L. & FitzGerald, D. J. Reduction of furin-nicked Pseudomonas exotoxin A: an unfolding story. *Biochemistry* **38**, 16507–16513 (1999).
 201. Beattie, B. K. & Merrill, A. R. In vitro enzyme activation and folded stability of Pseudomonas aeruginosa exotoxin A and its C-terminal peptide. *Biochemistry* **35**, 9042–9051 (1996).
 202. Frenzel, A., Hust, M. & Schirrmann, T. Expression of recombinant antibodies. *Front Immunol* (2013).
 203. Matsuuchi, L. *et al.* The membrane IgM-associated proteins MB-1 and Ig-beta are sufficient to promote surface expression of a partially functional B-cell antigen receptor in a nonlymphoid cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 3404–3408 (1992).
 204. Seegmiller, A. C., Xu, Y., McKenna, R. W. & Karandikar, N. J. Immunophenotypic differentiation between neoplastic plasma cells in mature B-cell lymphoma vs plasma cell myeloma. *Am. J. Clin. Pathol.* **127**, 176–181 (2007).
 205. Weiser, P., Riesterer, C. & Reth, M. The internalization of the IgG2a antigen receptor does not require the association with Ig- α and Ig- β but the activation of protein tyrosine kinases does. *European journal of Immunology* **24**, 665–71 (1994).
 206. Dykstra, M. L., Longnecker, R. & Pierce, S. K. Epstein-Barr virus coopts lipid rafts to block the signaling and antigen transport functions of the BCR. *Immunity* **14**, 57–67 (2001).
 207. Berard, M. *et al.* Mitochondria connects the antigen receptor to effector caspases during B cell receptor-induced apoptosis in normal human B cells. *J Immunol* **163**, 4655–4662 (1999).
 208. Zakas, P. M., Vanijcharoenkarn, K., Markovitz, R. C., Meeks, S. L. & Doering, C. B. Expanding the ortholog approach for hemophilia treatment complicated by factor VIII inhibitors. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **13**, 72–81 (2014).
 209. Shan, L., Liu, Y. & Wang, P. Recombinant Immunotoxin Therapy of Solid Tumors: Challenges and Strategies. *J Basic Clin Med* **2**, 1–6 (2013).
 210. Pai-Scherf, L. H. *et al.* Hepatotoxicity in cancer patients receiving erb-38, a recombinant immunotoxin that targets the erbB2 receptor. *Clin. Cancer Res.* **5**, 2311–2315 (1999).
 211. Minckwitz, von, G. *et al.* Phase I clinical study of the recombinant antibody toxin scFv(FRP5)-ETA specific for the ErbB2/HER2 receptor in patients with advanced solid malignomas. *Breast Cancer Res.* **7**, R617–26 (2005).
 212. Wang, C., Gao, W., Feng, M., Pastan, I. & Ho, M. Construction of an

- immunotoxin, HN3-mPE24, targeting glypican-3 for liver cancer therapy. *Oncotarget* **8**, 32450–32460 (2017).
213. Onda, M. *et al.* Inhibition of TNF-alpha produced by Kupffer cells protects against the nonspecific liver toxicity of immunotoxin anti-Tac(Fv)-PE38, LMB-2. *J Immunol* **165**, 7150–7156 (2000).
 214. Onda, M. *et al.* Lowering the isoelectric point of the Fv portion of recombinant immunotoxins leads to decreased nonspecific animal toxicity without affecting antitumor activity. *Cancer Res* **61**, 5070–5077 (2001).
 215. Baluna, R. & Vitetta, E. S. Vascular leak syndrome: a side effect of immunotherapy. *Immunopharmacology* **37**, 117–132 (1997).
 216. Weldon, J. E. & Pastan, I. A guide to taming a toxin--recombinant immunotoxins constructed from Pseudomonas exotoxin A for the treatment of cancer. *FEBS J.* **278**, 4683–4700 (2011).
 217. Kreitman, R. J. Immunotoxins for targeted cancer therapy. *AAPS J* **8**, E532–51 (2006).
 218. Brooks, S. A. Appropriate glycosylation of recombinant proteins for human use: implications of choice of expression system. *Mol Biotechnol* **28**, 241–255 (2004).
 219. Collins, P. W. *et al.* Rituximab and immune tolerance in severe hemophilia A: a consecutive national cohort. *J. Thromb. Haemost.* **7**, 787–794 (2009).
 220. Miller, J. J. An autoradiographic study of plasma cell and lymphocyte survival in rat popliteal lymph nodes. *J Immunol* **92**, 673–681 (1964).
 221. Radbruch, A. *et al.* Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 741–750 (2006).
 222. Zhang, A. H., Skupsky, J. & Scott, D. W. Effect of B-cell depletion using anti-CD20 therapy on inhibitory antibody formation to human FVIII in hemophilia A mice. *Blood* **117**, 2223–2226 (2011).
 223. Franchini, M. & Mannucci, P. M. Inhibitor eradication with rituximab in haemophilia: where do we stand? *British Journal of Haematology* **165**, 600–608 (2014).

8 Abkürzungsverzeichnis

ADCC	Antikörper-abhängiger zellvermittelter Zytotoxizität
ADP	Adenosindiphosphat
AHA	erworbene Hämophilie A
AID	Activation-induced Cytidine Deaminase
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
AS	Aminosäuren
ASZ	Antikörper-sekretierende Zelle(n)
BU	Bethesda units
BZR	B-Zellrezeptor
CAR	chimären Antigen-Rezeptor
CD40L	CD40 Ligand
CDC	komplementabhängige Toxizität
CIP	Alkaline Phosphatase
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CTLA-4	<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
CTLA-4	<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
Cy7	Cyanine 7
Da	Dalton
EF-2	eukaryotischen Elongationsfaktor 2

ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ELISPOT	enzyme-linked immunospot assay
ETA	Exotoxin A
ETA	Exotoxin A
EU	Endotoxin-Einheiten
EU	<i>endotoxin units</i>
F	Farad
FEIBA	<i>factor eight inhibitor bypassing activity</i>
FVa	aktivierter Faktor fünf
FVIIa	aktivierter Faktor sieben
FVIII	humaner Faktor acht
FVIII ^{-/-}	FVIII <i>knockout</i>
FXa	aktivierter Faktor zehn
g	Gramm
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
hA2	humane A2-Domäne
HBV	Hepatitis B-Virus
hC2	humane C2-Domäne
HC _M	schwere Kette der membranständigen Antikörperform
HC _S	schwere Kette der sekretierten Antikörperform
HCV	Hepatitis C-Virus

HIV	Humanes Immunodefizienzvirus
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
HSA	humanes Serum Albumin
HSA	humanes Serumalbumin
IgG	Immunglobulin G
IL-10	Interleukin 10
IMAC	Immobilized Metal Ion Chromatography
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
ITI	Immuntoleranz-Therapie
IVC	individuell-ventiliert
k	Kilo (10^3)
l	Liter
LMP2A	latentem Membranprotein 2A
LPS	Lipopolysaccharide
LPS	Lipopolysaccharide
LRP	<i>low-density lipoprotein receptor-related protein</i>
M	Mol pro Liter
mAb	monoklonaler Antikörper
MHCII	<i>Major Histocompatibility Complex Class II</i>
mlg	membranständiges Immunglobulin
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoproteins

mRNA	<i>messenger DNA</i>
MTD	Maximal tolerierte Dosis
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MWCO	<i>molecular weight cutt off</i>
n	nano (10^{-9})
Ohm	Ohm
ORF	open reading frame
p	pico (10^{-12})
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
pFVIII	porciner FVIII
rpm	Umdrehungen pro Minute
SA	Standardabweichung
scFv	<i>single-chains variable fragement</i> s
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SPF	spezifisch-pathogenfrei
TF	Tissue Factor
TM	Transmembranregion
TNF α	Tumor-Nekrose Faktor α
TNF α	Tumor-Nekrose Faktor α
T _{regs}	regulatorische T-Zellen
tRNA	Transfer-DNA

TZR	T-Zellrezeptors
UV	Ultraviolettstrahlung
V	Volt
vWF	von Willenbrandt Faktor
μ	mikro (10 ⁻⁶)

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Risikofaktoren für die Entwicklung von FVIII-Inhibitoren (modifiziert nach Witmer <i>et al.</i> ¹³²).....	25
Tabelle 2: IMAC-Programm des ÄktaPrime-Systems mit gradieller Elution	43
Tabelle 3: Eigenschaften und Verwendung der eingesetzten Antikörper	47
Tabelle 4: Eigenschaften und Epitopspezifität monoklonaler muriner anti-hA2-Antikörper (adaptiert aus Markovitz <i>et al.</i> ¹⁰⁷). Dargestellt sind Namen der monoklonalen Antikörper (mAbs), Inhibitortiter (BU/mg IgG), Inhibitor-Kinetik (Typ), muriner Isotyp, Epitopspezifität und Gruppenzugehörigkeit.*nicht anwendbar auf nicht-inhibitorische Antikörper; † nicht bestimmbar (<i>Indeterminate</i>)	122
Tabelle 5: Eigenschaften monoklonaler anti-hC2-Antikörper (adaptiert aus Meeks <i>et al.</i> ¹¹¹). Bis auf BO2C11 sind alle Antikörper murinen Ursprungs. Dargestellt sind Namen der monoklonalen Antikörper (mAbs), muriner Isotyp, Gruppenzugehörigkeit, Inhibitortiter (BU/mg IgG) und Inhibitor-Kinetik (Typ), Gruppenzugehörigkeit; nicht bestimmbar (<i>Indeterminate</i>)	123

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der sekundären Hämostase.	10
Abbildung 3: Interaktionen von FVIII im Tenase-Komplex..	13

Abbildung 4: Die Entwicklung einer FVIII-spezifischen Immunantwort..	17
Abbildung 5: Primäre und sekundäre Immunantwort gegen FVIII..	18
Abbildung 6: Schematischer Aufbau des B-Zellrezeptors	19
Abbildung 7: Venn-Diagramme der Epitope von A2- und C2-spezifischen Antikörpern.....	23
Abbildung 8: Schematische Darstellung von Exotoxin A aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (modifiziert nach Wolf <i>et al.</i> ¹⁶⁷).....	31
Abbildung 9: Schematische Darstellung der rekombinant hergestellten Proteine.	53
Abbildung 10: Aufreinigung und Charakterisierung von hC2-ETA.....	56
Abbildung 11: Stabilität der hC2-Domäne in hC2-ETA und FVIII.....	57
Abbildung 12: Aufreinigung und Charakterisierung von hA2-ETA.	60
Abbildung 13: Aufreinigung und Charakterisierung von ETA.....	61
Abbildung 14: Aufreinigung und Charakterisierung von HSA-hC2.....	64
Abbildung 15: Lebendzellzahl von BO2C11-Hybridomas	66
Abbildung 16: Analyse des Zelllysats aus Raji- und BO2C11-Hybridomazellen im Westernblot.	67
Abbildung 17: Durchflusszytometrische Analyse von BO2C11-Hybridomas..	68
Abbildung 18: FVIII-spezifische Immunantwort in FVIII ^(-/-) -Mäusen und Restimulation FVIII-spezifischer Gedächtnis-B-Zellen <i>ex vivo</i>	70
Abbildung 19: Selektive Eliminierung hC2-spezifischer B-Zellen <i>ex vivo</i>	72
Abbildung 20: Schematische Darstellung zum zeitlichen Ablauf der Eliminierung hC2-spezifischer B-Zellen und Analyse der FVIII-spezifischen Immunantwort.	75
Abbildung 21: Eliminierung hC2-spezifischer B-Zellen <i>in vivo</i>	77
Abbildung 22: Analyse der hC2-spezifischen Immunantwort der mit hC2-ETA oder Kontrollen behandelten FVIII ^(-/-) -Mäuse.....	79

Abbildung 23: Analyse der hC2-spezifischen Immunantwort der mit hC2-ETA behandelten FVIII ^(-/-) -Mäuse mithilfe hitzeinaktivierter und nicht hitzeinaktivierter Plasmen.....	80
Abbildung 24: Plasmidkarte des Vektors pSW220 zu bakteriellen Expression der ETA-Fusionsproteine.	110
Abbildung 25: Plasmidkarte des Vektors SplgkHSA zur Produktion von HSA-Fusionsproteinen in 293T HEK-Zellen.	111