

# UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Kopf und Neurozentrum, Klinik und Poliklinik für Neurologie  
Diagnostikzentrum, Institut für Immunologie

Prof. Dr. med. Christian Gerloff  
Prof Dr. Marcus Altfeld

## **Pharmakologische Charakterisierung von P2X7-blockierenden Nanobodies *in vitro* und *in vivo***

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Domenica Iacenda  
aus Wiesbaden

Hamburg 2018

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 20.11.2018**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Tim Magnus**

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Lucie Carrier**

# Inhalt

1. Einleitung .....	6
1.1 Das angeborene Immunsystem.....	6
1.1.1 Der P2X7-Rezeptor .....	7
1.2 Das adaptive Immunsystem .....	9
1.2.1 Antikörper .....	10
1.2.2 Nanobodies.....	11
1.2.3 P2X7 blockierende Nanobodies .....	13
Fragestellung .....	14
2. Material und Methoden .....	15
2.1 Material .....	15
2.1.1 Antikörper .....	15
2.1.2 Chemikalien .....	15
2.1.3 Enzyme.....	17
2.1.4 Kits .....	17
2.1.5 Medien und Puffer.....	18
2.1.6 Laborgeräte.....	21
2.1.7 Laborutensilien.....	22
2.1.8 Mausstämme.....	23
2.1.9 Nanobodies.....	23
2.1.10 Plasmide .....	24
2.1.11 Zelllinien .....	24
2.2 Methoden.....	25
2.2.1 Klonierung.....	25
2.2.2 Produktion P2X7-spezifischer Nanobodies .....	29
2.3 Charakterisierung von P2X7-spezifischen Nanobodies <i>in vitro</i> .....	30

2.3.1 ATP-Titration an stabil transfizierten mP2X7-HEK-Zellen .....	30
2.3.2 Titration mP2X7-spezifischer Nanobodies an stabil transfizierten mP2X7-HEK-Zellen.....	31
2.3.3 Titration mP2X7-spezifischer Nanobodies an stabil transfizierten mP2X7-HEK-Zellen –Calciumversuch.....	31
2.4 Charakterisierung von P2X7-spezifischen Nanobodies <i>in vivo</i> .....	31
2.4.1 Injektion der Nanobodies .....	32
2.4.2 Präparation von T-Lymphozyten aus der Milz.....	32
2.4.3 Präparation von T-Zellen aus Lymphknoten.....	33
2.4.4 Präparation von peritonealen Makrophagen .....	33
2.4.5 Nachweis der P2X7-Blockade auf T-Zellen .....	33
2.4.6 Nachweis der P2X7-Blockade auf peritonealen Makrophagen .....	34
2.4.7 Präparation von Blutserum.....	35
2.5. HEK-Zellkultur .....	35
2.5.1 Nachweis der P2X7-Blockade auf HEK-Zellen.....	35
3. Ergebnisse .....	36
3.1 Produktion von heterotrimeren 13A7-Nanobodies in HEK-Zellen .....	36
3.2 Pharmakologische Untersuchung von P2X7-spezifischen Nanobodies <i>in vitro</i> .....	37
3.2.1 Ermittlung der optimalen ATP-Konzentration zur Aktivierung von P2X7 auf mP2X7-transfizierte HEK Zellen.....	38
3.2.2 P2X7-spezifische 13A7-Nanobodies inhibieren die P2X7-Aktivierung <i>in vitro</i> ....	39
3.3 P2X7-spezifische 13A7-Nanobodies inhibieren die P2X7-Aktivierung <i>in vivo</i> .....	41
3.3.1 Analyse der P2X7-Blockade auf T-Zellen in Lymphknoten und Milz nach Injektion von 13A7-Nanobodies.....	41
3.3.2 Analyse der P2X7-Blockade auf Makrophagen im Peritoneum nach Injektion von 13A7-Nanobodies.....	44
3.3.3 Nachweis von 13A7-Nanobodies im Serum von Mäusen nach Injektion .....	46

3.4 Klonierung und Untersuchung von weiteren P2X7-spezifischen Nanobody Konstrukten .....	48
3.4.1 Generierung von 1c81-Fc-Fusionsproteinen mit D265A Mutation .....	48
3.4.2 Untersuchung der Blockierenden Eigenschaften von 1c81mFcD265A in vitro .....	49
4. Diskussion .....	51
Zusammenfassung .....	57
Summary .....	58
Abkürzungsverzeichnis .....	60
Liste der aus der Dissertation hervorgegangenen Vorveröffentlichungen .....	62
Literaturverzeichnis .....	63
Patent .....	71
Danksagung .....	72
Lebenslauf .....	73
Eidesstattliche Versicherung .....	74

# 1. Einleitung

Das Immunsystem hat die Aufgabe den Organismus vor äußeren und inneren Bedrohungen zu schützen. Im Laufe der Evolution hat es nicht nur gelernt zwischen eigenen und fremden Zellen zu unterscheiden, sondern schützt den Körper auch vor pathogenen Umwelteinflüssen wie Viren und Bakterien. Außerdem kann es den Organismus auch von körpereigenen entarteten Zellen befreien. Wirbeltiere besitzen ein Immunsystem, welches aus einer unspezifischen angeborenen und einer adaptiven erlernten Komponente aufgebaut ist.

## 1.1 Das angeborene Immunsystem

Zum angeborenen Immunsystem gehören in erster Instanz Barriere bildende Strukturen, wie das Stratum corneum der Haut, Schleimhäute im Darm und im Respirationsstrakt (Rassow, Hauser, Netzker, & Deutzmann, 2008). Gelingt es Keimen diese Strukturen zu überwinden, werden sie von phagozytierenden Zellen wie Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und natürlichen Killerzellen detektiert und eliminiert (Murphy, K., Travers, P., Walport, 2009). Zur Unterscheidung zwischen pathogenem und körpereigenem Material nutzen die Zellen des angeborenen Immunsystems pathogen-erkennende Rezeptoren (PRR). Durch die Bindung eines Pathogens an einen PRR, wird eine schnelle Immunreaktion herbeigeführt. Diese Reaktion kann im Sinne einer Phagozytose des Erregers stattfinden, oder zur Erzeugung von Effektormolekülen führen, die weitere Immunzellen chemotaktisch zum Infektionsort lenken. Des Weiteren kann auch das adaptive Immunsystem aktiviert und in seiner Art der Immunantwort beeinflusst werden. Merkmale, die von den PRR erkannt werden, sind repetitive molekulare Strukturen an der Oberfläche von Mikroorganismen, wie z. B. Lipopolysaccharide der Zellwand gramnegativer Bakterien, Lipoteichonsäuren der Zellwand grampositiver Bakterien, Zuckerstrukturen wie mannosereiche Oligosaccharide und nicht methylierte Wiederholungen des Dinucleotids CpG in bakterieller Desoxyribonukleinsäure (DNA). Allgemein werden diese Strukturen als pathogen-assoziierte molekulare Muster (pathogen-associated molecular patterns, PAMP) bezeichnet (Murphy, K., Travers, P., Walport, 2009).

Auch Traumata, die mit Zelltod einhergehen, stellen eine Bedrohung für den Organismus dar. Sterben Zellen einen unkoordinierten (nekrotischen) Zelltod, werden endogene Moleküle in

den Extrazellulärraum freigesetzt. Da diese Moleküle normalerweise nicht, oder nur in sehr geringen Konzentrationen extrazellulär vorhanden sind, agieren sie als Gefahrensignal für das Immunsystem. Aus diesem Grund werden sie „Gefahren assoziierte molekulare Muster“ (danger-associated molecular patterns, DAMP) genannt. Beispiele für solche DAMP sind das High mobility group box 1 Protein (HMGB1), Hitzeschockproteine aber auch Adenosintriphosphat (ATP) (Bianchi, 2007; Vitiello, Gorini, Rosano, & La Sala, 2012). DAMP werden ebenfalls von PRR erkannt.

Da sowohl Infektionen als auch Traumata eine Bedrohung für den Organismus darstellen und auch oft miteinander einhergehen, wie z.B. im Falle einer bakteriellen Superinfektion einer Wunde, führt die Aktivierung von bestimmten PRR wie den Toll-like-Rezeptoren über PAMP und DAMP zu einer molekularen Signalkaskade, die in einer Entzündungsreaktion enden kann (Bianchi, 2007).

Ein weiterer PRR, der sowohl Entzündungsreaktionen als auch den koordinierten (apoptischen) Zelltod herbeiführen kann, ist der P2X7-Rezeptor.

### **1.1.1 Der P2X7-Rezeptor**

Der P2X7-Rezeptor (P2X7) ist ein trimerer, ligandengesteuerter Ionenkanal aus der Familie der Purinrezeptoren (Coddou, Yan, Obsil, Huidobro-Toro, & Stojilkovic, 2011). Er ist im Organismus von Vertebraten weit verbreitet (Surprenant & North, 2009) und wird auf Zellen des hämatopoetischen Systems, insbesondere auf Monozyten, peripheren Makrophagen, Erythrozyten, T- und B- Lymphozyten, dendritischen Zellen, Mastzellen und epidermalen Langerhans Zellen exprimiert (North, 2002). Außerdem wurde seine Existenz auf Zellen des zentralen Nervensystem wie Mikroglia, Schwannzellen und Astrozyten nachgewiesen (Collo et al., 1997; Ferrari, Chiozzi, Falzoni, Hanau, & Di Virgilio, 1997; Sim, Young, Sung, North, & Surprenant, 2004).

ATP gilt als der physiologische Aktivator des P2X7 (Ferrari et al., 1997). Steigt die extrazelluläre ATP-Konzentration an, kann ATP nicht-kovalent an P2X7 binden (Warrell, 2012). Dieser Ionenkanal wird dann permeabel für Kationen und erlaubt einen Ausstrom von Kaliumionen und einen Einstrom von Natrium- und Calciumionen (Skaper, Debetto, & Giusti, 2010) (Abb.1). Die extrazelluläre ATP-Konzentration steigt vor allem an, wenn ATP

durch aktivierte Immunzellen im Entzündungsprozess (Lazarowski, Boucher, & Harden, 2000) oder durch sterbende Zellen freigesetzt wird (Nieber, Eschke, & Brand, 1999).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass proinflammatorische Zytokine und Signalmoleküle bakteriellen Ursprungs, wie das Lipopolysaccharid (LPS) einen positiven Einfluss auf die P2X7-Expression haben und seine Sensitivität gegenüber extrazellulärem ATP erhöhen können (Humphreys & Dubyak, 1998; Narcisse, Scemes, Zhao, Lee, & Brosnan, 2005).

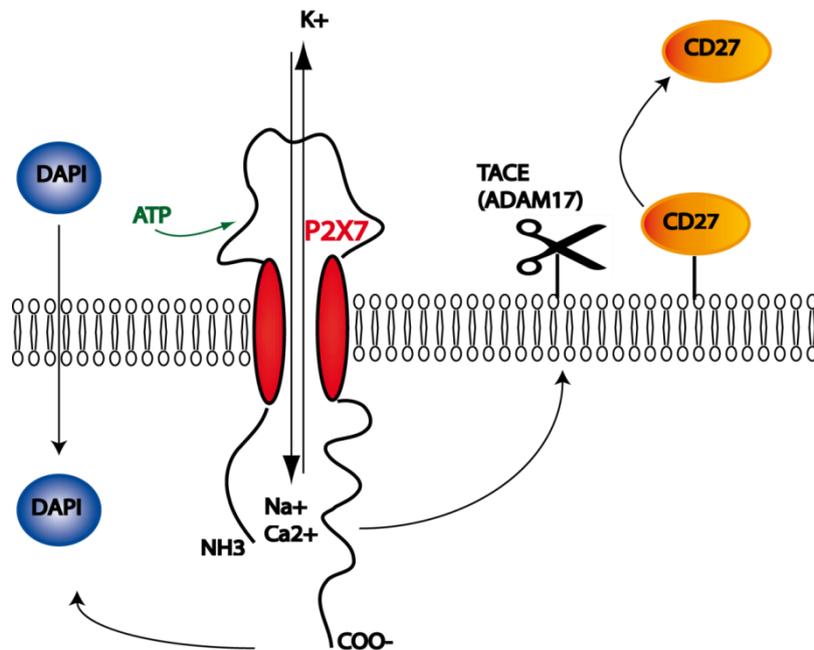
Eine der am besten charakterisierten Funktion von P2X7 ist die Rolle bei der Prozessierung und Freisetzung von Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) durch Makrophagen und Mikroglia (Ferrari et al., 1997).

Die Freisetzung von IL-1 $\beta$  aus diesen Zellen wiederum führt zu einer erhöhten Expression von Genprodukten, wie Matrix-Metalloproteasen, Cyclooxygenase 2 (COX-2), weiteren Interleukinen und zellulären Adhäsionsmolekülen, die alle zu Entzündungsvorgängen führen (Guan, Buckman, Miller, Springer, & Morrison, 1998). P2X7 kann somit durch seine Fähigkeit die Prozessierung und die Freisetzung von IL-1 $\beta$  zu beeinflussen, eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Entzündungsprozessen zugeschrieben werden. Des Weiteren wird vermutet, dass die P2X7-Aktivierung an der Entstehung von neurodegenerativen, immunologischen und depressiven Erkrankungen beteiligt ist (Skaper et al., 2010). Sogar die Entstehung verschiedener karzinogener Erkrankungen könnte durch P2X7-Aktivierung begünstigt werden (Lister et al., 2007). Studien mit P2X7-defizienten Mäusen konnten zeigen, dass diese weniger anfällig für rheumatoide Arthritis (Labasi et al., 2002), chronische Entzündung und neuropathischen Schmerz sind (Chessell et al., 2005).

Wird P2X7 über einen längeren Zeitraum aktiviert, kommt es zu einer Ausbildung einer Pore in der Zellmembran. Durch diese können hydrophile Moleküle bis 900Da in die Zelle diffundieren. Dieser ermöglichte Ioneninflux führt unweigerlich zum Zelltod (Di Virgilio, 1995). Es wird vermutet, dass dieser Prozess des P2X7-induzierten Zelltods auch zur Expansion des geschädigten Zellareals nach einem Schlaganfall beiträgt (Franke, Krügel, & Illes, 2006). Es konnte ebenso gezeigt werden, dass durch gezielte P2X7-Blockade der neuronale Zellschaden nach einem ischämischen Schlaganfall reduziert werden konnte (Arbeloa, Pérez-Samartín, Gottlieb, & Matute, 2012).

Aus diesen Fakten wird deutlich, dass extrazelluläre ATP-Konzentration, Zelltyp und das Umgebungsmilieu der Zelle einen Einfluss auf die durch P2X7 ausgelösten Signalkaskaden und somit auf die Folgen der P2X7-Aktivierung haben (Burnstock, 2007).

Hieraus wird ebenso ersichtlich, dass P2X7 mit seinen vielfältigen modulativen Eigenschaften Einfluss auf die Entstehung vieler Erkrankungen hat und somit ein attraktives Ziel für therapeutische Substanzen darstellen könnte.



**Abb.1: P2X7-Aktivierung auf T-Zellen und Makrophagen.** Die Aktivierung von P2X7 durch ATP führt zu einer gesteigerten Enzymaktivität von TACE, welche das Oberflächenantigen CD27 von der Zelloberfläche abspaltet. Gleichzeitig wird die Zellmembran bei P2X7-Aktivierung permeabel für den Farbstoff DAPI.

## 1.2 Das adaptive Immunsystem

Dieser Teil des Immunsystems wird im Wesentlichen von B- und T-Lymphozyten gebildet. Nach Aktivierung durch T-Lymphozyten, sind B-Lymphozyten in der Lage Antikörper zu produzieren. Während die Strukturen des angeborenen Immunsystems von Geburt an vorhanden sind, hat das adaptive Immunsystem durch seine Genvariabilität die Fähigkeit gegen fast jedes Pathogen im Laufe des Lebens einen spezifischen Antikörper zu entwickeln und Gedächtniszellen auszubilden (Rassow et al., 2008).

### 1.2.1 Antikörper

Antikörper bestehen aus zwei langen schweren und zwei kurzen leichten Ketten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Ihre molare Masse beträgt 150kDa. Die leichte Kette besteht aus einer variablen ( $V_L$ ) und einer konstanten ( $C_L$ ) Domäne. Die schwere Kette besitzt hingegen eine variable ( $V_H$ ) und drei konstante ( $C_H$ ) Domänen. Die variablen Domänen beider Ketten ( $V_L$  und  $V_H$ ) tragen im gleichen Maße mit ihrem N-Terminale Ende zur Bindungsstelle für das Antigen bei. Diese Antigenbindungsstelle wird auch als Fab-Fragment (antigenbindendes Fragment) bezeichnet. Der Teil, der nicht zur Antigenbindung beiträgt, wird als Fc-Fragment bezeichnet. Die von einer B-Zelle produzierten Antikörper sind in ihrer Aminosäuresequenz identisch und werden deshalb als monoklonale Antikörper bezeichnet (Murphy, K., Travers, P., Walport, 2009; Rassow et al., 2008).

Seit Emil von Behring und Shibasaburo Kitasato die ersten Versuche mit dem Einsatz von Seren machten, um Krankheiten wie Diphtherie und Tetanus zu bekämpfen (Behring, E. & Kitasato, 1890), hat die Therapie von Krankheiten mittels Antikörpern stetig an Bedeutung gewonnen. Beispielsweise hat die Anwendung des von Yalow und Berson etablierten Radioimmunoassays durch die Anwendung von Antikörpern zur Detektion von Antigenen im Serum (Berson & Yalow, 1968) oder die Quantifizierung von Antigenen mittels Antikörpern im Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Engvall & Perlmann, 1971) neue Möglichkeiten zur Diagnostik von Krankheiten eröffnet.

Seit es Milstein und Köhler 1975 gelang mittels Hybridomtechnik monoklonale Antikörper gegen verschiedene Antigene zu produzieren, indem sie B-Zellen mit Myelomzellen fusionierten (Milstein & Alerts, 2005) (Köhler, Milstein, 1975), werden monoklonale Antikörper sowohl in der Diagnostik als auch zur gezielten Therapie von Krankheiten in der Medizin eingesetzt (An, 2010).

Von besonderem Interesse sind Antikörper in der modernen Krebstherapie. So ist Rituximab als monoklonaler Antikörper zur Behandlung von chronisch lymphatischer Leukämie bereits 1994 erfolgreich in Studien eingesetzt worden (Maloney et al., 1994). Monoklonale Antikörper gelten im Bereich der Krebstherapie als relativ nebenwirkungsarm, verglichen mit konventionellen Chemotherapeutika. Jedoch stellen allergische Reaktionen, das im Rahmen einer Antikörpertherapie auftretende Tumorlysesyndrom oder das Cytokine Release Syndrome die Entwickler vor neue Herausforderungen (Hansel, Kropshofer, Singer, Mitchell, & George, 2010). Des Weiteren wurde beobachtet, dass zuvor durchlebte Erkrankungen, wie

Tuberkulose durch die Behandlung mit Anti-TNF $\alpha$ -Antikörpern reaktiviert werden können (Hansel et al., 2010). Auch eine Reaktivierung des John Cunningham (JC) –Virus im zentralen Nervensystem und damit die Auslösung einer progressiven multifokalen Leukenzephalopathie durch Behandlung mit Natalizumab, einem monoklonalen Antikörper, der zur Behandlung der Multiplen Sklerose eingesetzt werden kann, wird berichtet (Hansel et al., 2010). Letztlich gilt es die Eigenschaften von monoklonalen Antikörpern im Hinblick auf ihren Einsatz als Therapeutikum weiter zu optimieren. So haben Antikörper beispielsweise nur eine sehr langsame Gewebe- und Tumorpenetration, welche den Einsatz bei soliden Tumoren erschweren kann (Chames, Van Regenmortel, Weiss, & Baty, 2009).

### 1.2.2 Nanobodies

Zusätzlich zu den konventionellen Antikörpern besitzen Spezies aus den Familien der *Camelidae*, zu denen Kamele, Lamas und Alpaka gehören und der Klasse der *Chondrichthyes*, zu denen die Haie zählen, sogenannte Schwere-Ketten-Antikörper (Wesolowski et al., 2009). Diese Antikörper zeichnen sich dadurch aus, dass sie lediglich aus zwei schweren Ketten bestehen, die leichten Ketten, wie sie in klassischen Antikörpern vorkommen, fehlen. Jede Kette besitzt an ihrem N-terminalen Ende eine variable Domäne, die als VHH (variable domain of camelid heavy chain antibody) oder VNAR (variable domain of the shark new antigen receptor) bezeichnet wird. In Schwere-Ketten-Antikörpern sind ausschließlich diese variablen Domänen für die Antigenbindung verantwortlich (Hamers-Casterman et al., 1993; Serge Muyldermans, 2013). Wird diese variable Domäne gentechnisch als rekombinantes Protein exprimiert, stellt sie mit einer Größe von 15kDa die kleinste antigenbindende Einheit dar und wird als Einzeldomänenantikörper oder Nanobody bezeichnet (Rissiek, Koch-Nolte, & Magnus, 2014).

Die klassischen Antikörper nutzen die schwere und leichte Kette zur Antigenbindung, hierdurch ist ihre Bindungsstelle gewöhnlich planar oder konkav geformt. Nanobodies bieten den Vorteil, dass ihre Complementarity determining region 3 (CDR3), welche für die Antigenbindung verantwortlich ist, fingerförmige Ausstülpungen bildet. Mit dieser können sie in molekulare Vertiefungen, wie den aktiven Zentren von Enzymen, binden und diese blockieren. Konventionelle Antikörper binden mit ihren flachen Paratopen hingegen meist außerhalb des aktiven Zentrums von Enzymen (Holliger & Hudson, 2005). Zusätzlich können

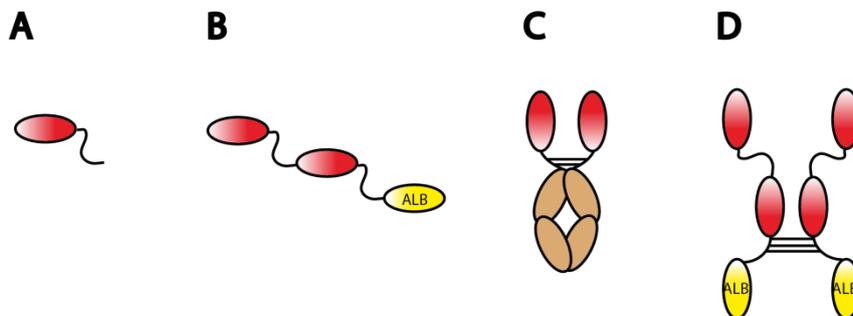
Nanobodies hohe Löslichkeit, pH-Neutralität, gute Gewebepenetration und die Möglichkeit sich, nach Deformation, in ihre ursprüngliche Form zurückzufalten aufweisen (Wesolowski et al., 2009). Dadurch, dass Nanobodies spezifisch gegen ein Antigen gebildet werden, weisen sie hohe Selektivität in ihrem Bindungsverhalten auf (Jähnichen et al., 2010). Es besteht außerdem die Möglichkeit Nanobodies genetisch miteinander zu fusionieren. Hierbei entstehen Homodimere, wenn zwei gleiche Nanobodies miteinander kombiniert oder Heterodimere, wenn unterschiedliche Nanobodies zusammengefügt werden. Auch die Generierung von multimeren Konstrukten ist möglich. Hierbei werden unterschiedliche Nanobodies kombiniert, die jeweils an ihre eigenen Zielstrukturen binden. Durch Dimerisierung der Nanobodies wird ihre Avidität zu ihrem Zielmolekül erhöht und geht mit einem verbessertem Bindungsverhalten einher (Serge Muyldermans, 2013). Da Nanobodies mit einer Größe von 15kDa unterhalb der Nierenfiltrationsgrenze liegen, werden sie äußerst schnell über die Niere ausgeschieden. Durch diese Eigenschaft können sie zu diagnostischen Zwecken eingesetzt werden, ohne langfristig im Kreislauf zu zirkulieren (Tijink et al., 2008). Die Fusion von Nanobodies an Fluorochrome oder Radioisotope erlaubt beispielsweise ihre *in vivo* Anwendung in bildgebenden Verfahren (Rashidian et al., 2015). Um ihre *in vivo* Halbwertszeit zu verlängern, kann ein Nanobody mit einem Anti-Serum-Albumin-Nanobody kombiniert werden (Dennis et al., 2002; Tijink et al., 2008). Ebenso kann durch Klonierung von Nanobodies an einen Fc-Teil eines Immunglobulin G (IgG) das Molekulargewicht auf 90 kDa und damit über die Nierenfiltrationsgrenze angehoben werden. Die Vorteile des Nanobodies mit seiner langen CDR3-Bindungsdomäne bleiben dabei erhalten (Wesolowski et al., 2009). Ersetzt man zusätzlich noch Asparaginsäure durch Alanin an Position 265 in der CH2-Domäne des Fc-Teils, kann die Interaktion mit Fc-Rezeptoren von phagozytierenden Zellen nahezu komplett unterbunden werden. Außerdem wird das Komplementsystem durch diese Mutation weniger aktiviert (Baudino et al., 2008). Beides hat zur Folge, dass die *in vivo* Halbwertszeit verlängert wird.

Nanobodies weisen hohe Thermostabilität auf und können gut über Monate bei 4°C und länger bei -20°C gelagert werden. Auch eine über mehrere Wochen andauernde Inkubationszeit bei 37°C ergab keine funktionellen Einbußen (Serge Muyldermans, 2013). Außerdem ist es Nanobodies durch ihre geringe Größe möglich, an Zelloberflächenproteine oder Ionenkanäle wie den P2X7-Rezeptor zu binden.

Bisher konnte keine Immunreaktion auf Nanobodies in Versuchen mit Lebewesen nachgewiesen werden, welches ihrer geringen Größe zugeschrieben wird (Serge Muyldermans, 2013). Somit entsteht eine Vielzahl von Möglichkeiten Nanobodies therapeutisch einzusetzen.

### 1.2.3 P2X7 blockierende Nanobodies

Im Rahmen vorheriger Arbeiten wurden in der AG Nolte, Institut für Immunologie, UKE, P2X7-blockierende Nanobodies aus immunisierten Lamas gewonnen (Danquah W., Nolte F., Laermans T., Stortelers C, 2013. P2X7 receptor antagonists and agonists. Patent WO2013178783);( W. Danquah et al., 2016). Diese Nanobodies waren von der AG-Nolte bereits in verschiedenen Formaten rekombinant hergestellt worden (Abb.2). Hierzu waren die Nanobody-kodierenden Sequenzen in den eukaryotischen Expressionsvektor pCSE2.5 (Schirrmann & Büssow, 2010) kloniert worden, der in transient transfizierten HEK-6E Zellen (Zhang et al., 2009) die effiziente Produktion von rekombinanten Antikörpern ermöglicht. Die in dieser Arbeit vorgestellte Klonierung und rekombinante Produktion von Nanobodies erfolgte im Nolte Labor mit freundlicher Unterstützung der Mitarbeiter der AG Nolte.



**Abb.2: Nanobody-Formate.** Nanobodies wurden in verschiedenen Formaten für die *in vivo* Versuche verwendet: **(A)** als Monomer (15kDa), **(B)** als Heterotrimer (Dim-Alb) bestehend aus zwei anti-P2X7-Nanobodies und einem anti-Albumin-Nanobody (45kDa), **(C)** als Fc-Fusionprotein bestehend aus einem anti-P2X7-Nanobody und dem Fc-Teil eines konventionellen Antikörpers, welches bei der Expression Dimere bildet (45kDa) sowie **(D)** als Dimer-Hinge-Alb-Konstrukt, das aus vier anti-P2X7- und zwei anti-Albumin-Nanobodies besteht (90kDa).

## **Fragestellung**

Die hier beschriebene Arbeit beschäftigt sich mit der pharmakologischen Analyse des P2X7-blockierenden Nanobody-Klons 13A7 sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Die zentrale Fragestellung war, unter welchen Bedingungen, sowohl zeitlich, als auch in welcher Konzentration der Nanobody-Klon 13A7 den P2X7-Rezeptor *in vivo* zuverlässig blockieren kann. Des Weiteren sollte untersucht werden, wie lange die Nanobodies im Blutkreislauf von Mäusen zirkulieren und, ob sie in der Lage sind, in verschiedene Organsysteme einzudringen. Abschließend sollte ein weiterer P2X7-spezifischer Nanobodyklon (1c81) durch Fusion an den Fc-Teil eines Maus Immunglobulins für die *in vivo* Anwendung optimiert und *in vitro* getestet werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Antikörper

<i>Antigen</i>	<i>Fluorochrom</i>
CD4 APC	Biolegend
CD8a perCP	Biolegend
CD11b FITC	Biolegend
CD16/32 unkonjugiert	BioXcell
CD27-perCP	Biolegend
CD27-PE	Biolegend

#### 2.1.2 Chemikalien

<i>Produkt</i>	<i>Firma</i>
ATP	Sigma-Aldrich
Aqua ad iniectabilia	Braun
antarktische Phosphatase	Invitrogen
antarktische Phosphatase Puffer	Invitrogen
Bovine Serum Albumin (BSA) 10x	Merck
Blasticidin	Invitrogen
Carbenicillin	Invitrogen

DAPI	AG Haag
DMEM	Gibco
ddH <sub>2</sub> O	UKE (Millipore)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	CalBiochem
Ethanol 20%	Walter GmbH
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA
Freestyle F17 Expressionsmedium	Gibco
Fluo4-AM	Invitrogen
Gentamycin	Serva
Genitacin	Gibco
HEPES	Gibco
Imidazol	Merck
jetPEI	Polyplus
LB-Carb Agar	BD/Difco
L-Glutamin	Gibco
Methanol	Walter GmbH
Natriumchlorid Lösung	Merck
Natriumpyruvat	Gibco
Nicht essentielle Aminosäuren (NEAA)	Gibco
Normal Rattenserum (NRS)	PAA
NuPAGE antioxidant	Invitrogen
NuPAGE sample reducing agent, 10x	Invitrogen

NuPAGE SDS-PAGE sample buffer, 4x	Invitrogen
NuPAGE transfer buffer, 20x	Invitrogen
Phosphate buffered saline (PBS) -/- ohne Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>	Gibco
PBS +/- mit Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>	Gibco
Puffer 3.1 10x	Gibco
RPMI 1640	Gibco
Supermarker	AG Nolte
Trypsin 10x	Invitrogen

### 2.1.3 Enzyme

<i>Produkt</i>	<i>Firma</i>
NotI	New England Biolabs
XbaI	New England Biolabs
T4 Ligase	Invitrogen

### 2.1.4 Kits

<i>Produkt</i>	<i>Firma</i>
BCA™ Protein Assay kit	Pierce
NucleoSpin, Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
QIAprep Spin Maxi- und Minipräp kit	Qiagen

### **2.1.5 Medien und Puffer**

#### ***ACK Erythrozyten Lysepuffer (ACK Puffer), 1x***

NH<sub>4</sub>Cl 155mM (8,29g)

KHCO<sub>3</sub> 10mM (1g)

EDTA 100μM (0,037g)

ddH<sub>2</sub>O (1L), auf pH 7,2 einstellen

#### ***Coomassiefärbung***

Colloidal Blue Staining Kit (Invitrogen)

55ml H<sub>2</sub>O

20ml Methanol

20ml Stainer A

5ml Stainer B

#### ***Transfektionsmedium***

500ml Freestyle Expressionsmedium

10ml L-Glutamin

5ml Pluronic 10%

#### ***Trypsinlösung***

PBS -/- ohne Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> 90ml

Trypsin 10ml

***Elutionspuffer (Ni-NTA)***

2.65mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

46.35mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

0.3M NaCl

250mM Imidazol

pH 8 in deionisiertem Wasser

***DMEM Kompletmedium***

DMEM Medium

FCS 50ml (10%)

HEPES Puffer 5ml (1%)

NEAA 5ml (1%)

Natriumpyruvat 5ml (1%)

L-Glutamin 5ml (1%)

Gentamycin 500µl (1:1000)

***Kulturmedium für HEK-293 6-E-Zellen***

500ml Freestyle F17 Expressionsmedium

10ml L-Glutamin

5ml Pluronic

250µl G418 (Genitacin)

5ml FCS

### ***F17 feeding Medium***

Transfektionsmedium mit 20% Trypton

### ***SOC-medium***

0.5 % Hefeextrakt

2 % Trypton

10mM NaCl

2.5mM KCl

10mM MgCl<sub>2</sub>

10mM MgSO<sub>4</sub>

20mM Glucose

### ***2xYT Medium***

31g/l (deionisiertes Wasser)

## **2.1.6 Laborgeräte**

### ***Gerät***

### ***Firma***

Brutschrank: inCu safe

Sanyo

Durchflusszytometer: FACS Canto II

Becton Dickinson

ELISA Reader: Victor 3

Perkin Elmer

Mikroskop: Axiovert25

Zeiss

Sterile Werkbank: Hera safe

Heraeus

Zentrifuge: Rotanta 460R

Hettich

Zentrifuge: Biofuge pico

Heraeus

### ***Laborkleingeräte***

### ***Firma***

Gelelektrophoresekammer

Invitrogen

Neubauerzählkammer

Laboroptik

Nanodrop

Peqlab biotechnology

Pipetboy

Integra

Thermocycler

Biometra

Vortex Mixer

neoLab

Wasserbad

Gesellschaft für Labortechnik

### ***Pipetten***

Eppendorf Research 1000

Eppendorf

Eppendorf Research 200

Eppendorf

Eppendorf Research 100	Eppendorf
Eppendorf Research 20	Eppendorf
Eppendorf Research 10	Eppendorf
Eppendorf Research 200	Multikanal Eppendorf

### **2.1.7 Laborutensilien**

<i>Produkt</i>	<i>Firma</i>
Cellstrainer (70µM Maschenweite)	Becton Dickinson, Heidelberg
Einmalhandschuhe Vibrant	Aurelia
Entsorgungsbeutel	Brand
FACS Röhrchen	Polystyrene BD
Falcon Röhrchen 15 ml	Greiner
Falcon Röhrchen 50 ml	Greiner
Filter, steril	Millipore
Insulinspritze	BD
Micro FACS Röhrchen	BD
Mikrotiterplatte, 96-Napf, Format (U)	Nunc
Mikrotiterplatte, 96-Näpfe, Format (V)	Greiner bio one
Nickel-NTA-Chromatographie Säule	Invitrogen
Parafilm	Pechiney plastic packaging
PD-10 Desalting Columns	GE Healthcare
Pipettenspitzen blau 1000µl	Sarstedt

Pipettenspitzen gelb 200µl	Sarstedt
Pipettenspitzen grau 10µl	Sarstedt
Reagiergefäß 1,5ml	Eppendorf
Reagiergefäß 2ml	Eppendorf
Serologische Pipette 25ml	BD Falcon
Serologische Pipette 10ml	BD Falcon
Serologische Pipette 5ml	BD Falcon
SDS-PAGE Gel	Invitrogen
Spritze 5ml	Braun
Spritze 10ml	Braun
Zellkulturflaschen	Becton Dickinson, Heidelberg
Zellsieb 70µM	Falcon

### **2.1.8 Mausstämme**

<i>Name</i>	<i>Herkunft</i>
C57Bl/6	UKE, Hamburg

### **2.1.9 Nanobodies**

<i>Klon/Format</i>	<i>Herkunft</i>
13A7His	AG Nolte
13A7mFcD265A	AG Nolte
13A7Dim35GSAlb	AG Nolte

13A7Dim15GSHingeAlb	AG Nolte
1c81His	AG Nolte
1c81Dim35GSAIb	AG Nolte
DummyDim35GSAIb	AG Nolte

### **2.1.10 Plasmide**

<i>Name</i>	<i>Herkunft</i>
WD#22 1c81Dim35GSAIb	AG Nolte
WD#49 13A7Dim35GSAIb	AG Nolte
WD#52 DummyDimAlb	AG Nolte
FS#477 1c81mIgG WT	AG Nolte
FS#503 14D5mFcG2cD265A	AG Nolte

### **2.1.11 Zelllinien**

<i>Name</i>	<i>Firma</i>
E.coli (XL-2 Blue)	Stratagene
HEK-293 6-E	AG Nolte
mP2X7-HEK	AG Nolte

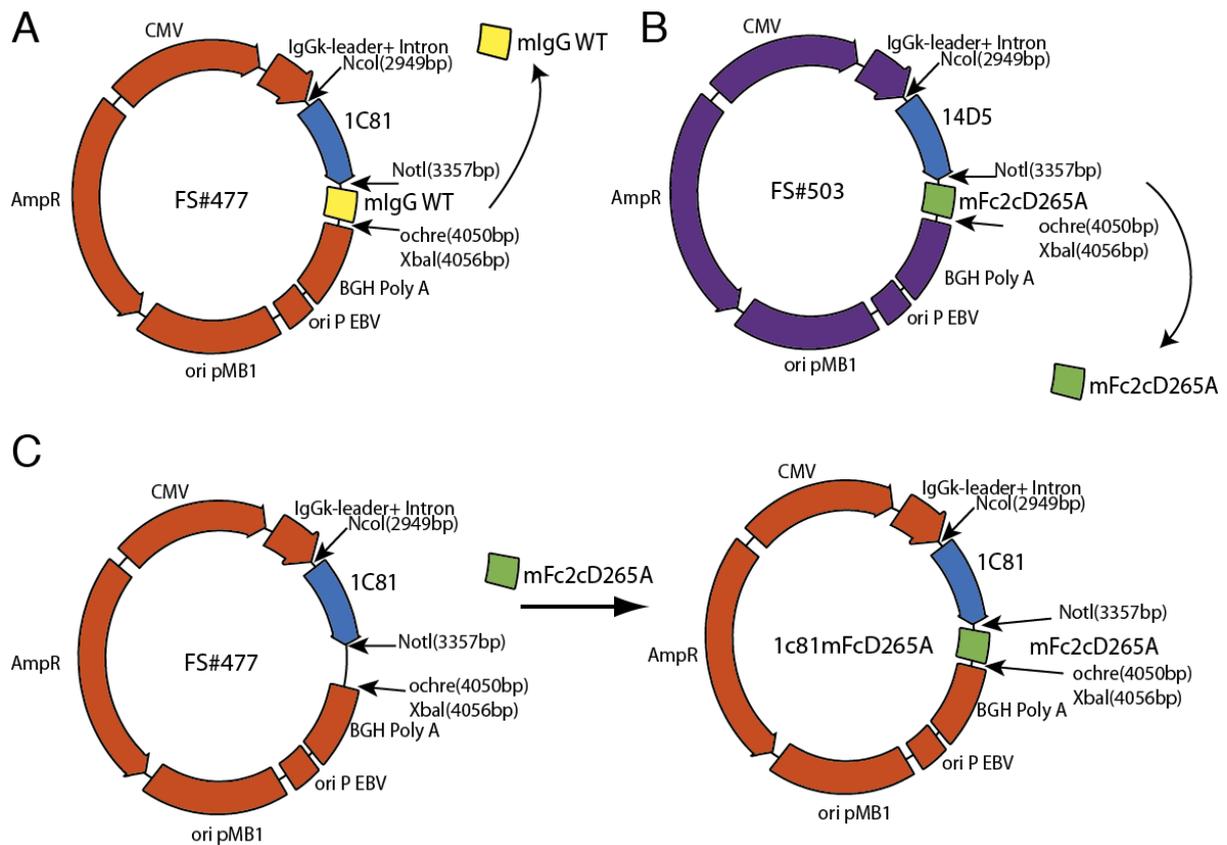
## **2.2 Methoden**

Die in den folgenden Abschnitten 2.2.1 und 2.2.2 beschriebene Klonierung und Produktion von rekombinanten Nanobodies wurden im Labor der AG Nolte mit freundlicher Unterstützung der Mitarbeiter der AG Nolte durchgeführt.

### **2.2.1 Klonierung**

#### ***2.2.1.1 Umklonierung des Nanobodies 1c81mFc in 1c81mFcD265A***

Für die Umklonierung wurde der pCSE 2.5 Plasmidvektor FS#477 benutzt. Dieser trägt die Information für den Nanobody 1c81 und den Maus-IgG-Wildtyp-Fc-Teil (mIgG2-WT-Fc). Durch Umklonierung wurde der mIgG-WT-Teil durch den mIgG-Fc-Teil mit der Mutation D265A (Insert) ersetzt. Dieses Insert wurde aus dem Plasmid FS#507 (14D5mFcG2cD265A) gewonnen (Abb.3) (Schirrmann & Büssow, 2010).



**Abb.3: Schema der Klonierung des 1c81mFcD265A.** Aus dem Plasmid FS#477 wurde die Information für den Fc-Teil mIgG-WT entfernt und gegen den aus dem Plasmid FS#503 gewonnenen Fc-Teil mFc2cD265A ersetzt.

### 2.2.1.2 Restriktionsverdau

Um den Vektor und das Insert ligieren zu können, musste sowohl das Vektorplasmid als auch das Insertplasmid durch die Restriktionsenzyme NCO1 und XBA1 zerschnitten werden. Die benötigten Substanzen wurden nach folgendem Pipetierschema zusammengegeben:

	FS#477 (c= 100ng/µl)	FS#507 (c=160ng/µl)
BSA 10x in µl	2	2
Puffer 3.1 10x in µl	2	2
Aqua in µl	10	10
Restriktionsenzym NotI in µl	1	1
Restriktionsenzym XBA1 in µl	1	1
Vektor/Insert in µl	4	4
Gesamtvolumen in µl	20	20

Beide Ansätze wurden für 7 Std. bei 37°C inkubiert.

### ***2.2.1.3 Dephosphorylierung***

Zu dem Gesamtvolumen des Restriktionsverdau des Vektors und des Inserts (je 20 $\mu$ l) wurden je 2,2 $\mu$ l antarktische-Phosphatase-Puffer und 1 $\mu$ l antarktische-Phosphatase gegeben, um die Religation der Plasmide zu verhindern. Die Ansätze wurden erst für 1Std. bei 37°C, danach für 20min. bei 65°C im Thermocycler inkubiert. Im nächsten Schritt wurden sie auf 4°C heruntergekühlt.

### ***2.2.1.4 Agarosegelelektrophorese und Gelaufreinigung***

Zu jeweils 20 $\mu$ l des Vektors und des Inserts wurden 4 $\mu$ l 6x loading dye gegeben und auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Als Marker wurden 4 $\mu$ l 1kb DNA ladder (Supermarker) verwendet. Die Laufzeit betrug 20min.

Die Banden wurden unter UV-Licht mit einem Skalpel aus dem Gel geschnitten und in bereitgestellte Reaktionsgefäße (Eppis) überführt.

Die Gelstücke wurden mithilfe des MACHEREY-NAGEL Kits nach Protokoll aufgereinigt.

Mittels des Nanodrop-Spektrometers wurden die Konzentrationen des Vektors (FS#477) 63,4ng/ $\mu$ l und des Inserts (FS# 503) 60,6ng/ $\mu$ l bestimmt.

### ***2.2.1.5 Ligation***

Um Vektor und Insert zu vereinigen, wurden 1,5 $\mu$ l des Vektors und 1 $\mu$ l des Inserts mit 5,5 $\mu$ l Aqua, 1 $\mu$ l T4 Ligase Puffer und 1 $\mu$ l Ligase für 14Std. bei 16°C im Thermocycler inkubiert.

### ***2.2.1.6 Transformation***

Reaktionsgefäße (1,5ml) wurden mit je 50 $\mu$ l XL2 blue E.Coli Bakterien bestückt. Hinzu wurden je 3 $\mu$ l des neu ligierten Plasmids gegeben. Dieses Gemisch wurde daraufhin 20min. auf Eis inkubiert. Nach abgelaufener Inkubationszeit wurde das Reaktionsgemisch für weitere 30sec. bei 42°C im Wasserbad hitzeschock behandelt, damit das Plasmid von den Bakterien aufgenommen werden konnte. Daraufhin wurde es sofort wieder für 2min. auf Eis gestellt. 150 $\mu$ l vorgewärmtes SOC Medium wurden hinzugegeben. Die transformierten Bakterien

wurden anschließend für 1Std. bei 37°C und 500rpm im Heizblock geschüttelt. Danach wurden 50µl aus jedem Ansatz wurden auf LB-Agar mit Carbenicillin (100µg/ml) ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank inkubiert.

#### ***2.2.1.7 Auswahl der Klone***

Insgesamt wurden 22 Klone mit einer Pipettenspitze herausgepickt und über Nacht in 5ml 2xYT Medium im Brutschrank bei 220rpm wachsen gelassen.

Anschließend wurden die Klone bei 4000rpm zentrifugiert. Mit Hilfe des QIAprep Spin Kits wurde die Plasmid DNA aus den Bakterien isoliert. Um zu überprüfen, ob die Punktmutation erfolgreich war, wurde die DNA der 22 Klone sequenziert. Die Sequenzierung wurde von den SeqLab Laboren in Göttingen angefertigt.

#### ***2.2.1.8 Testtransfektion***

Für die Testtransfektion wurden HEK-293 6E-Zellen in Kulturmedium verwendet. Das Procedere wurde in T25 Zellkulturflaschen durchgeführt. Vor der Transfektion wurden die Zellen mit 3ml Transfektionsmedium gewaschen. Anschließend wurde 5ml Transfektionsmedium auf die Zellen gegeben. Zur Testtransfektion wurden Klon 5, 10 und 15 ausgewählt. Von diesen Klonen wurden je 5µg der Plasmid-DNA mit 250µl Transfektionsmedium gemischt. Außerdem wurde, in separaten Tubes, je 250µl Transfektionsmedium mit 12,5µl JetPEI angesetzt. Die JetPEI-Lösungen wurden auf die DNA-Lösungen transferiert und bei Raumtemperatur für 20min. inkubiert. Anschließend wurden die DNA-Jet-PEI-Lösungen auf drei T25 Zellkulturflaschen mit HEK-Zellen gegeben und für 24Std. bei 37°C im Brutschrank belassen. Zusätzlich wurde nach gleichem Verfahren der Nanobody 1c81mFcG2WT (FS#477) als Kontrolle angesetzt. Nach 24Std wurden 125µl Feeding Medium auf die Zellen gegeben. Die Zellen verblieben anschließend für 5 Tage bei 37°C im Brutschrank.

Nach diesen 5 Tagen wurde der Zellüberstand abpipettiert und für 10min. bei 4000rpm zentrifugiert.

Anschließend wurde eine Transfektionskontrolle per SDS-PAGE durchgeführt.

## **2.2.2 Produktion P2X7-spezifischer Nanobodies**

### ***2.2.2.1 Transfektion***

HEK-293 6E-Zellen wurden in T225 Zellkulturflaschen (30ml) mit je 20µg Plasmid-DNA (WD#49, WD#52 und WD#22) und 50µl JetPEI pro Flasche transfiziert. Die Transfektion wurde in F17 Transfektionsmedium durchgeführt. Einen Tag nach der Transfektion wurden die Zellen mit 750µl Feeding Medium pro Flasche versetzt.

### ***2.2.2.2 Nanobody Extraktion***

Nach 5 Tagen wurde der Zellüberstand, in dem sich die produzierten Nanobodies befanden, in 50ml Falcon Tubes überführt und für 10min. bei 4000rpm und 4°C zentrifugiert.

Für das 13A7Dim35GSAlb-Konstrukt ergaben sich 90ml, DummyDim35GSAlb 60ml und 1c81Dim35GSAlb 30 ml Zellüberstand.

### ***2.2.2.3 SDS-Gelkontrolle (Transfektionskontrolle)***

Zur Transfektionskontrolle wurden 10µl jeder Probe mit 5µl LDS Sample Loading Buffer, 5µl Wasser und 10% Dithiothreitol (DTT) gemischt. Diese Suspension wurde daraufhin für 15min. bei 70°C erwärmt. Danach wurden die Proben auf ein 10%-iges SDS-Gel geladen. Die Proben wurden für 25min. bei 200V auf dem Gel wandern gelassen. Danach kamen die Gele über Nacht in eine Coomassie Färbung.

### ***2.2.2.4 Proteinaufreinigung***

Nach erfolgreicher Transfektion wurden die produzierten Nanobody-Konstrukte, die mit einem Hexahistidin-Tag (His) exprimiert werden, per Affinitätschromatographie über Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA-) Chromatographiesäulen aus dem Zellüberstand extrahiert. In einem Aufreinigungsdurchgang wurden je Konstrukt 30ml Zellüberstand und jeweils separate Chromatographiesäulen verwendet. Diese 30ml Zellüberstand wurden zunächst zweimal

durch die Säulen gegeben. Die Säule wurde daraufhin mit 10ml PBS (-/-) gewaschen. Daraufhin wurden die Konstrukte in drei Durchgängen (Eluat1 = 1ml, Eluat2 = 2,5ml und Eluat3 = 2,5ml) mit Elutionspuffer aus der Säule gelöst. Anschließend wurde eine Gelkontrolle der Eluate durchgeführt, um den Proteingehalt abzuschätzen. Bei wenig Ertrag an Proteinen wurden die Proben ein zweites Mal, nach oben beschriebem Verfahren, aufgereinigt (Zhang et al., 2009).

#### **2.2.2.5 Umpufferung**

Die gewonnenen Nanobodies wurden anschließend in PD10 Säulen mit 3,5ml PBS (+/+) umpuffert. Zur Konzentrierung wurden die Proteine in Amicon Ultra Centrifugal filter columns überführt und bei 4000rpm für 15min. zentrifugiert.

#### **2.2.2.6 Konzentrationsbestimmung**

Um die Konzentration der produzierten Nanobodies zu bestimmen, wurde das BCA™ Protein Assay kit nach Werksprotokoll verwendet.

### **2.3 Charakterisierung von P2X7-spezifischen Nanobodies *in vitro***

#### **2.3.1 ATP-Titration an stabil transfizierten mP2X7-HEK-Zellen**

HEK-Zellen, die den Maus-P2X7-Rezeptor stabil exprimierten (mP2X7-HEK-Zellen), wurden in sieben Ansätzen á  $10^5$  Zellen/100µl in RPMI Medium vorbereitet. Anschließend wurden die Zellen mit 50µl DAPI 1:100 für 15min. inkubiert. Durch serielle 1:2 Verdünnungen wurden ATP-Lösungen von 10mM bis 0,312mM hergestellt. Sechs der mP2X7-HEK-Zellansätze wurden daraufhin mit 50µl ATP-Lösung versetzt. Der siebte Ansatz verblieb als Kontrolle und wurde mit 50µl RPMI behandelt. Die Ansätze wurden für 15min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze sofort auf Eis gestellt und das DAPI-Signal mittels Durchflusszytometrie gemessen.

### **2.3.2 Titration mP2X7-spezifischer Nanobodies an stabil transfizierten mP2X7-HEK-Zellen**

M-P2X7-HEK-Zellen wurden in sieben Ansätzen á  $10^5$  Zellen/100 $\mu$ l in RPMI Medium vorbereitet. Je 1 $\mu$ M der zu testenden Nanobodies wurde in  $1:\sqrt{10}$  Schritten seriell bis auf 10pM verdünnt. 50 $\mu$ l der verdünnten Nanobody-Lösungen wurden auf 100 $\mu$ l Zellen gegeben und 20min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 50 $\mu$ l 6mM ATP-Lösung (finale Konzentration: 1,5mM) und DAPI (1:100) auf die Zellen gegeben und für 15min. bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Daraufhin wurden die Ansätze auf Eis gestellt und das DAPI-Signal anschließend mittels Durchflusszytometrie gemessen.

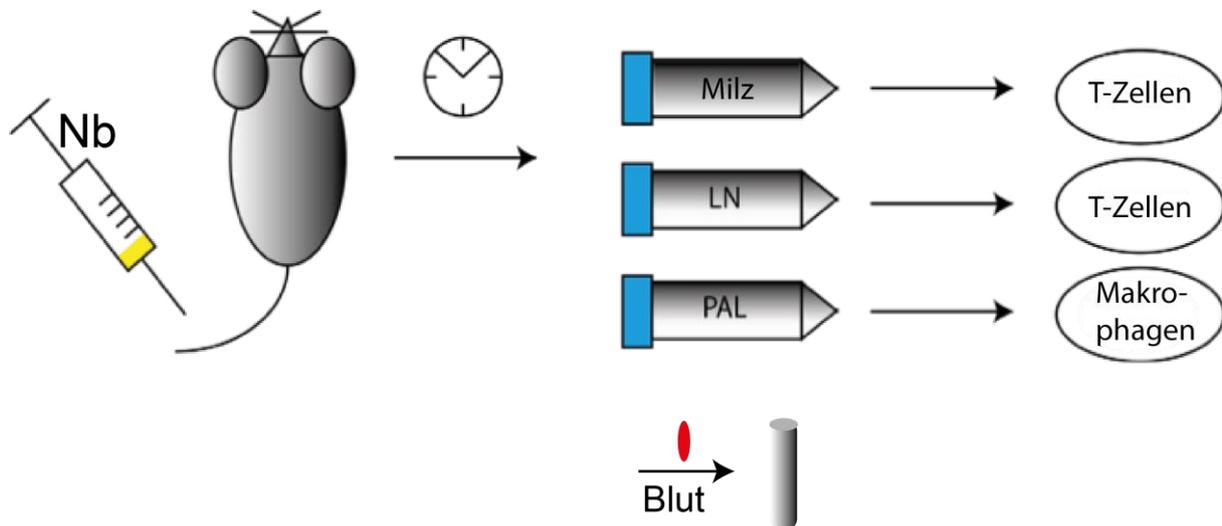
### **2.3.3 Titration mP2X7-spezifischer Nanobodies an stabil transfizierten mP2X7-HEK-Zellen –Calciumversuch**

3ml in PBS (+/+) gelöste M-P2X7 stabil transfizierte HEK-Zellen wurden mit 6 $\mu$ l Fluo4-AM beladen und zuerst für 20min. bei Raumtemperatur und daraufhin für 15min. bei 37°C inkubiert. Die verschiedenen Nanobody-Konstrukte, wurden in  $1:\sqrt{10}$  Schritten seriell bis auf 312nM (Monomer) bzw. 100nM (13A7dim35GSAIb, 13A7mFcD265A und 13A7Dim15GSHingeAlb) verdünnt. 50 $\mu$ l dieser Verdünnungen wurden jeweils auf 50 $\mu$ l der HEK-Zell-Lösungen gegeben und für 20min. bei 4°C inkubiert. Jeder Ansatz wurde in dreifacher Ausführung hergestellt. Anschließend wurden die Proben mit 100 $\mu$ l 3mM ATP-Lösung, versetzt mit DAPI, in den auf 37°C vorgeheizten VICTOR ELISA Reader gestellt und das Fluo4- sowie das DAPI-Signal über 20min detektiert.

## **2.4 Charakterisierung von P2X7-spezifischen Nanobodies *in vivo***

Durch *in vivo* Versuche an Mäusen wurde der blockierende Effekt verschiedener Nanobody-Konstrukte, die gegen den P2X7-Rezeptor gerichtet sind, getestet. Analysiert wurden die benötigte Dosis, die Wirkdauer und der Wirkort der Konstrukte (Abb.9). Zur Visualisierung des blockierenden Effekts wurde die Durchflusszytometrie verwendet. Hiermit konnte einerseits die Aufnahme des Farbstoffs DAPI in peritoneale Makrophagen beobachtet werden, der nach P2X7-Aktivierung oder Zelltod in die Zelle gelangen kann. Andererseits wurde das

Lymphozytenantigen CD27 betrachtet, das nach P2X7-Aktivierung von der Zelloberfläche von CD4<sup>+</sup> T-Zellen abgespalten wird (Abb.1) (Hubert et al., 2010)(B. Rissiek, Danquah, Haag, & Koch-Nolte, 2014).



**Abb.4: Charakterisierung von P2X7-spezifischen Nanobodies *in vivo*.**

Verschiedene Nb-Konstrukte wurden intravenös in C57BL/6 Mäuse injiziert. Nach unterschiedlichen Wirkzeiträumen wurden die Mäuse letal narkotisiert. Milz, Lymphknoten, peritoneale Makrophagen, sowie Blut wurden gewonnen, um den Effekt der Nanobodies auf den P2X7- Rezeptor der jeweiligen Zellen zu analysieren und die Verweildauer im Organismus zu messen.

### 2.4.1 Injektion der Nanobodies

C57BL/6 Mäusen wurden intravenös (i.v.) zwei bis 100µg eines Nanobody-Konstrukts (13A7monomer, 13A7Dim35GSAIb, 13A7Dim15GSHingeAlb, 13A7mFc, 1c81) injiziert. Nach verschiedenen Zeiträumen zwischen 10min. bis 14 Tagen wurde den Mäusen eine letale Narkose appliziert. Milz, Lymphknoten und Blut wurden entnommen. Außerdem wurde eine Peritoneallavage (PAL) zur Gewinnung peritonealer Makrophagen durchgeführt (Abb.4).

### 2.4.2 Präparation von T-Lymphozyten aus der Milz

Um T-Lymphozyten aus der Milz zu gewinnen, wurde diese zunächst durch ein Zellsieb gerieben. Die Zellsuspension wurde mit 10ml PBS (-/-) + 1% FCS gewaschen und bei

1600rpm 5min. zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde mit 5ml ACK-Lyse Puffer resuspendiert und für 1min. inkubiert. Der Lysepuffer wurde danach bei 1600rpm für 5min. abzentrifugiert. Die Zellen wurden nun in 4ml PBS (-/-) +1% FCS resuspendiert und bis zur Weiterverarbeitung auf Eis verwahrt (B. Rissiek et al., 2014).

#### **2.4.3 Präparation von T-Zellen aus Lymphknoten**

Die präparierten Lymphknoten (LN) wurden zwischen zwei Membranen zerrieben und mit 10ml PBS (-/-) +1% FCS gewaschen. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 1600rpm 5min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1ml PBS (-/-) + 1% FCS resuspendiert und bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert (B. Rissiek et al., 2014).

#### **2.4.4 Präparation von peritonealen Makrophagen**

Für die peritoneale Lavage wurde PBS (-/-) mit 2mM EDTA versetzt. Pro Maus wurden 5ml dieser Lösung ins Peritoneum appliziert. Die peritonealen Makrophagen wurden durch schütteln der Maus aus dem Peritoneum gelöst und mitsamt der Flüssigkeit in eine Spritze aspiriert.

Die Zellsuspension wurde nach Entnahme zügig bei 1600rpm für 5min. zentrifugiert und in 500µl PBS (-/-) + 1% FCS resuspendiert. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Zellen auf Eis gelagert (B. Rissiek et al., 2014).

#### **2.4.5 Nachweis der P2X7-Blockade auf T-Zellen**

Durch die Aktivierung des P2X7-Ionenkanals durch ATP können verschiedene zelluläre Prozesse, wie die Abspaltung des Membranproteins CD27 auf T-Lymphozyten beobachtet werden (Moon, Na, Chong, & Kim, 2006). Durch den blockierenden Effekt, den die zuvor in die Maus applizierten Nanobodies auf P2X7 ausüben, sollte gezeigt werden, dass diese zellulären Prozesse nicht aktiviert werden. Durch Markierung von CD27 mit Fluorochromgekoppelten monoklonalen Antikörpern konnte der Verbleib des Oberflächenproteins auf den Lymphozyten verfolgt werden (Abb.9).

Hierfür wurden 500µl der Zellsuspension aus Milz bzw. Lymphknoten mit einem Fc-Block und Normal-Rattenserum (NRS) (je 1µl/100µl Zellsuspension) für 10min vorinkubiert, um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern. Um die Zellen als T-Lymphozyten in der Durchflusszytometrie identifizieren zu können, wurden sie mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gegen CD4<sup>+</sup> (APC) und zur Kontrolle des P2X7-blockierenden Effekts mit anti-CD27 (perCP), je 1µl/100µl Zellsuspension, für 25min. auf Eis gefärbt. Daraufhin wurden die Proben mit 1ml PBS (-/-) + 1% FCS gewaschen und bei 1600rpm für 5min. zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 400µl RPMI resuspendiert und mit DAPI (1µl/100µl Zellsuspension, Stock 50µg/µl) gefärbt und auf drei Proben aufgeteilt. Eine Probe verblieb als Kontrolle und wurde mit RPMI Medium versetzt. Die zweite wurde mit 1µg des jeweiligen Nanobody-Konstrukts 10min vorinkubiert und anschließend mit 0,25mM ATP versetzt. Der dritten Probe wurden nur 0,25mM ATP zugesetzt. Alle Proben wurden 15min. bei 37°C im Wasserbad erhitzt. Nach der Inkubationszeit wurden die Proben in Eiswasser gestellt und sofort mittels Durchflusszytometrie gemessen.

#### **2.4.6 Nachweis der P2X7-Blockade auf peritonealen Makrophagen**

Durch den Nachweis der Blockade des P2X7-Rezeptors auf peritonealen Makrophagen sollte gezeigt werden, wie schnell der Nanobody auch weniger gut durchblutete Körperareale wie das Peritoneum erreicht. Da beobachtet wurde, dass die Aufnahme des Farbstoffs DAPI in die Zelle durch eine Aktivierung des P2X7-Rezeptors vermittelt wird (Sun, Heid, Keyel, & Salter, 2013), wurde die Intensität der Farbstoffaufnahme in die Makrophagen als Maß der P2X7-Aktivierung gewertet.

Für dieses Experiment wurden die zuvor präparierten und auf Eis gelagerten peritonealen Makrophagen verwendet. Die unspezifischen Bindungen wurden ebenfalls mittels Fc-Block und NRS, 1µl/100µl Zellsuspension verhindert.

Um die Makrophagen in der Durchflusszytometrie sichtbar machen zu können, wurden diese mit Fluorochrom-gekoppeltem anti-CD11b (FITC) Antikörper versehen. Des Weiteren wurde wie bei den anderen Zellen verfahren, nur die ATP-Konzentration betrug hier 1,5mM.

Alle Daten aus der Durchflusszytometrie wurden mit FlowJo Version 9.6.2 und GraphPad Prism Version 6 ausgewertet.

## 2.4.7 Präparation von Blutserum

Um einen Hinweis auf die Konzentration des Nanobodies im Blut zu bekommen, wurde den Mäusen nach letaler Narkose mit einer heparinisierten Spritze per Herzpunktion 0,5 bis 1ml Blut entnommen. Die Zellbestandteile wurden durch zweimalige Zentrifugation bei 4000rpm für 5min. vom Blutserum getrennt.

Die Seren wurden anschließend auf mP2X7-transfizierte HEK-Zellen gegeben. Als Maß der P2X7-Aktivierung diente auch hier die Intensität der DAPI-Aufnahme in die Zellen.

## 2.5. HEK-Zellkultur

Um das Blutserum auf den Nanobody-Gehalt an mP2X7-HEK-Zellen testen zu können, wurden zunächst mP2X7-transfizierte HEK-Zellkulturen angelegt.

Die mit dem m-P2X7-Ionenkanal stabil transfizierten (293 6E) HEK- Zellen wurden in T75-Flaschen steril ca. 3 Tage in DMEM Kompletmedium mit Blasticidin (1:500) bis auf eine Dichte von etwa 75% im Brutschrank wachsen gelassen. Unter der sterilen Werkbank wurden die Zellen mit 10ml sterilem PBS (-/-) gewaschen und anschließend mit 4ml Trypsin von der Falsche gelöst. Der enzymatische Effekt wurde mit 6ml DMEM Kompletmedium gestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein 10ml Falcon Tube überführt und für 5min. bei 1600rpm zentrifugiert.

Die Zellen wurden anschließend mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer gezählt und auf eine Konzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt.

### 2.5.1 Nachweis der P2X7-Blockade auf HEK-Zellen

Das aus den *in vivo* Versuchen gewonnene Mäuseserum wurde fünf Mal im Verhältnis 1:10 mit PBS (-/-) + 1%FCS auf einer 96-well-Platte verdünnt und auf mit m-P2X7 transfizierte HEK-Zellen gegeben. Außerdem wurde als Standard im gleichen Verhältnis eine *ex vivo* Verdünnungsreihe aus dem verwendeten Nanobody (1µg/ 200µl PBS (-/-)) erstellt. Die Zellen wurden mit DAPI (1µl/100µl, Stock 50µg/µl) gefärbt, mit 2mM ATP inkubiert und für 15min. bei 37°C im Wasserbad erhitzt. Anschließend wurden die Zellen in Eiswasser gestellt und via Durchflusszytometrie gemessen.

Alle Daten wurden mit FlowJo Version 9.6.2 und GraphPad Prism Version 6 ausgewertet.

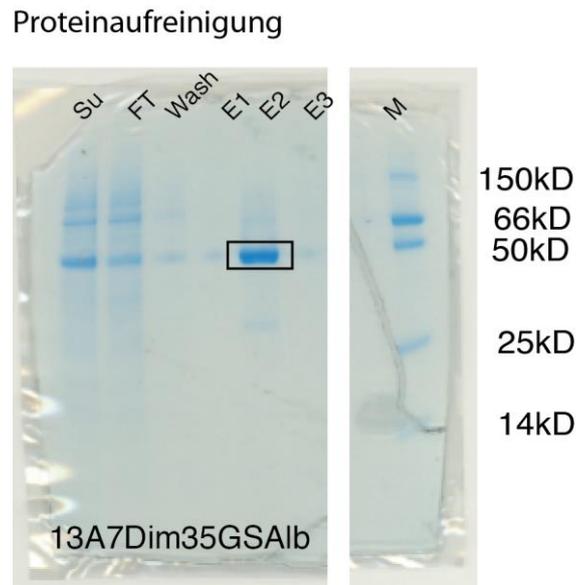
### 3. Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, die pharmakologischen Eigenschaften von verschiedenen Formaten des P2X7-blockierenden Nanobody-Klons 13A7 *in vitro* und *in vivo* zu analysieren. Zudem sollten neue Varianten des Klons 1c81 generiert, produziert und getestet werden. Der erste Teil dieser Doktorarbeit behandelt pharmakologische *in vitro* Untersuchungen von 13A7-Nanobody-Formaten an HEK-Zellen, die mit dem Maus-P2X7-Ionenkanal (mP2X7) stabil transfiziert worden sind.

#### 3.1 Produktion von heterotrimeren 13A7-Nanobodies in HEK-Zellen

Zunächst wurden verschiedene Nanobody-Konstrukte in HEK-293 6E-Zellen als lösliche rekombinante Proteine produziert, um ausreichend Nanobodies für die pharmakologischen *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen zur Verfügung zu haben. Exemplarisch ist hier die Produktion des 13A7-heterotrimeren-Nanobodies, bestehend aus zwei P2X7-spezifischen Nanobodies und einem albumin-spezifischen-Nanobody (13A7dimAlb), in HEK-Zellen beschrieben. Diese Konstrukte sind optimiert für den *in vivo* Einsatz, da sie zum einen aufgrund der zwei P2X7-spezifischen Nanobodies eine erhöhte Avidität aufweisen, zum anderen erhöht der albumin-spezifische-Nanobody (Alb) durch die Bindung an Serumalbumin die Verweildauer *in vivo* (Tijink et al., 2008).

Zu Beginn wurden HEK-Zellen mit einem für 13A7dimAlb kodierenden Expressionsplasmid transfiziert. Nach 5 Tagen wurde der Zellüberstand geerntet. Anschließend wurden die 13A7dimAlb Nanobodies aus dem Zellkulturüberstand mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt und in der SDS-Gelelektrophorese untersucht (Abb.5). Die durchgeführte Gel-Elektrophorese zeigte, dass sich der Großteil der produzierten 13A7dimAlb Konstrukte im Eluat 2 befand. 90ml Zellüberstand mit 13A7dimAlb transfizierten HEK Zellen ergaben 4,4mg rekombinantes Protein.



**Abb.5: SDS-Gel der Aufreinigung des 13A7Dim35GsAlb-Konstrukts.**

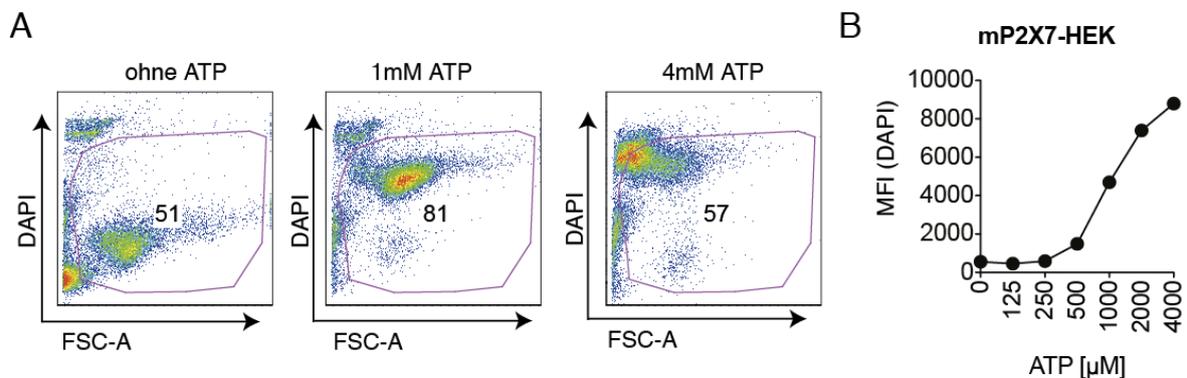
Die Zellkulturüberstände der transfizierten HEK-Zellen wurden zur Kontrolle auf ein SDS-Gel aufgetragen. Da die produzierten Nanobodies alle aus drei Nanobody-Einheiten bestehen, wurden ihre Banden bei 45-50kDa erwartet. Sup. = Supernatant, FT = FlowThrough, Wash = Waschgang, E1 = Eluat1, E2 = Eluat2, E3 = Eluat3. Die größte Menge an Protein ist im Eluat 2 zu sehen.

### 3.2 Pharmakologische Untersuchung von P2X7-spezifischen Nanobodies *in vitro*

ATP ist ein natürlicher Aktivator des P2X7-Ionenkanal (Ferrari et al., 1997). Zur Evaluation der antagonistischen Eigenschaften der 13A7-Konstrukte wurden mP2X7-transfizierte HEK-Zellen mit den verschiedenen 13A7-Konstrukten vorinkubiert, um eine Verbindung zwischen dem Nanobody und dem P2X7-Rezeptor zu ermöglichen. Anschließend wurden die Zellen mit ATP stimuliert. Als Indikator für die Aktivierung von P2X7 wurde die Aufnahme des DNA-Farbstoffs 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI), nach ATP-Stimulation gemessen. Die Aufnahme von DAPI in die Zellen wurde durch die Generierung einer Membranpore nach P2X7-Aktivierung ermöglicht (Abb.1).

### 3.2.1 Ermittlung der optimalen ATP-Konzentration zur Aktivierung von P2X7 auf mP2X7-transfizierte HEK Zellen

Um die geeignete ATP-Konzentration für die Aktivierung von mP2X7-transfizierten HEK Zellen zu bestimmen, wurde zunächst ein Dosis-Findungsversuch durchgeführt, da zu hohe ATP-Konzentrationen den Zelltod induzieren (Sun et al., 2013). Hierfür wurden die mP2X7-HEK-Zellen mit 0–4mM ATP bei 37°C für 10min. in Gegenwart von DAPI inkubiert und anschließend die DAPI Fluoreszenz durchflusszytometrisch gemessen (Abb.6A). Die mP2X7-HEK-Zellen zeigten einen Anstieg in der DAPI-Fluoreszenz ab 0,5mM ATP, welche mit steigender ATP-Konzentration weiter zunahm. Hohe ATP-Konzentrationen (ab 2.5mM ATP) führten jedoch zum Schrumpfen der Zellen, welches sich im forwards scatter (FSC-A) deutlich zeigte. Die mittlere effektive ATP-Dosis lag bei ca. 1,5mM ATP (Abb.6B). Für die *in vitro* Versuche mit mP2X7-HEK-Zellen wurde folglich eine ATP-Konzentration von 1,5mM gewählt, um ein deutliches DAPI-Signal bei P2X7-Aktivierung zu erhalten und gleichzeitig die Zellvitalität zu gewährleisten.



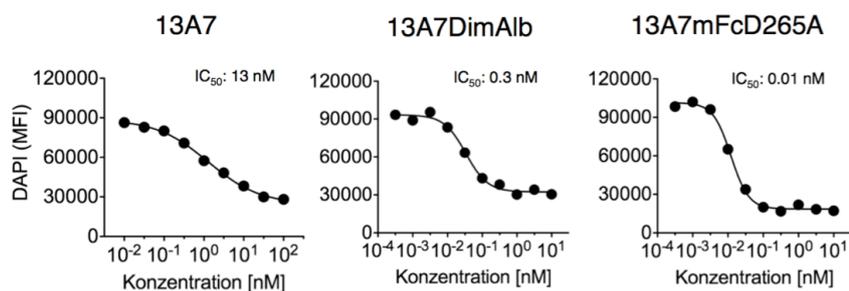
**Abb.6: Maus-P2X7-transfizierte-HEK-Zellen reagieren konzentrationsabhängig auf ATP. (A)** Gating Strategie der mP2X7-HEK-Zellen sowie DAPI-Aufnahme mit und ohne ATP-Behandlung. **(B)** 2,5mM ATP wurden seriell fünf Mal 1:2 verdünnt und auf mit DAPI vorinkubierte mP2X7-transfizierte HEK-Zellen gegeben. Die DAPI-Aufnahme wurde als Maß der P2X7-Aktivierung mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

### 3.2.2 P2X7-spezifische 13A7-Nanobodies inhibieren die P2X7-Aktivierung *in vitro*

Zur pharmakologischen Charakterisierung der verschiedenen 13A7-Nanobodies *in vitro* wurden ebenfalls mP2X7-transfizierte HEK-Zellen verwendet. Die mP2X7-HEK-Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen der 13A7-Nanobody-Konstrukte vorinkubiert und anschließend mit 1,5mM ATP bei 37 °C stimuliert. Anschließend wurden die Aufnahme von DAPI durch Bildung einer P2X7-induzierten Membranpore sowie der Einstrom von Calcium durch die Öffnung des P2X7-Ionenkanals gemessen. Die Potenz der verschiedenen 13A7-Konstrukte wurde anhand der ermittelten  $IC_{50}$  Werte bestimmt.

#### 3.2.2.1 Inhibition der ATP-vermittelten DAPI-Aufnahme

Um den Einfluss der 13A7-Nanobodies auf die durch P2X7-Aktivierung induzierte Membranpore zu evaluieren, wurden mP2X7-HEK-Zellen mit steigenden Konzentrationen von 13A7-Monomer, 13A7DimAlb sowie 13A7mFcD265A vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen in Gegenwart von DAPI mit 1,5mM ATP stimuliert und die DAPI-Fluoreszenz in den mP2X7-HEK-Zellen am Durchflusszytometer gemessen. Hierbei wurde deutlich, dass die Dimerisierung von 13A7-Monomeren ( $IC_{50} = 13\text{nM}$ ) zu 13A7DimAlb ( $IC_{50} = 0,3\text{nM}$ ) oder 13A7mFcD265A ( $IC_{50} = 0,01\text{nM}$ ) die Blockadeffektivität, gemessen an der  $IC_{50}$ , um den Faktor 40 bzw. 1000 erhöht (Abb.7).

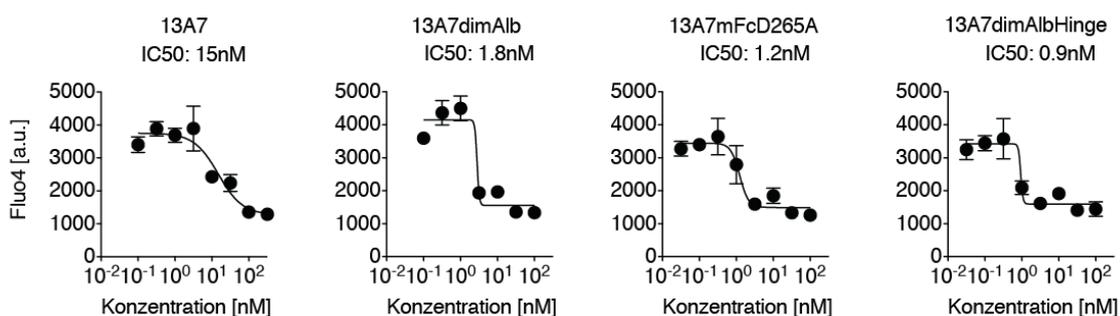


**Abb.7: 13A7-Nanobody-Konstrukte blockieren dosisabhängig die Aufnahme von DAPI nach ATP-Stimulation.** mP2X7-HEK-Zellen wurden mit steigenden Dosen von 13A7, 13A7DimAlb oder 13A7mFcD265A inkubiert (Höchstkonzentration Monomer: 100nM, Dimere: 10nM). Anschließend wurden die

Zellen mit 1,5mM ATP in Gegenwart von DAPI stimuliert und die DAPI-Aufnahme mittels Durchflusszytometrie gemessen.

### 3.2.2.2 Inhibition des ATP-vermittelten Calcium Einstroms

Zur weiteren Evaluierung des blockierenden Effekts der 13A7-Nanobodies wurde in diesem Versuch der Calciumeinstrom in HEK-Zellen untersucht. Hierzu wurden mP2X7-transfizierte HEK-Zellen mit dem Calciumsensor Fluo4-AM beladen. Anschließend wurden die Zellen mit verschiedenen 13A7-Nanobody-Konstrukten (Höchstkonzentration 100nM) vorinkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit 1.5mM ATP stimuliert und der calcium-vermittelte Anstieg in der Fluo4 Fluoreszenz abschließend am Fluoreszenzreader gemessen. Dabei zeigte sich, wie bereits zuvor bei der DAPI-Aufnahme, dass die Dimerisierung von 13A7 in Form von heterotrimeren Nanobodies (13A7DimAlb) oder Fc-Fusionsproteinen (13A7mFcD265A) die Blockade von P2X7 deutlich verbessert (ca. Faktor 10). In diesem Versuch wurde zudem erstmals ein neues 13A7-Konstrukt getestet: 13A7DimAlbHinge. Dieser Nanobody enthält zwei über eine Verbindungsregion fusionierte 13A7DimAlb Nanobodies und besteht somit aus vier 13A7 und zwei Anti-Albumin-Nanobodies. Im Titrationsversuch blockierte 13A7DimAlbHinge den P2X7-vermittelten Calcium Einstrom in etwa so gut wie die beiden dimeren 13A7-Konstrukte (Abb.8).



**Abb.8: 13A7-Nanobody-Konstrukte blockieren dosisabhängig den Einstrom von Calcium nach ATP-Stimulation.** mP2X7-HEK-Zellen wurden mit Fluo4-AM beladen und mit steigenden Dosen von 13A7, 13A7DimAlb, 13A7mFcD265A oder 13A7DimAlbHinge inkubiert (Höchstkonzentration 100nM). Anschließend wurden die Zellen mit 1,5mM ATP stimuliert und die Fluo4 Fluoreszenz wurde im Victor III Fluoreszenzreader gemessen. (n = 3 pro Messpunkt, Fehlerbalken: Standardabweichung) .

### **3.3 P2X7-spezifische 13A7-Nanobodies inhibieren die P2X7-Aktivierung *in vivo***

Der zweite Teil dieser Doktorarbeit behandelt die pharmakologischen *in vivo* Untersuchungen der 13A7-Nanobodies in der Maus. Hierfür wurden verschiedene Mengen an Nanobodies in Mäuse injiziert und die Blockade von P2X7 auf T-Zellen, in den peripheren Lymphknoten und der Milz untersucht. Ziel war es die verschiedenen 13A7-Formate *in vivo* zu evaluieren, um das vielversprechendste Konstrukt für die therapeutische Anwendung in Maus-Entzündungsmodellen zu bestimmen.

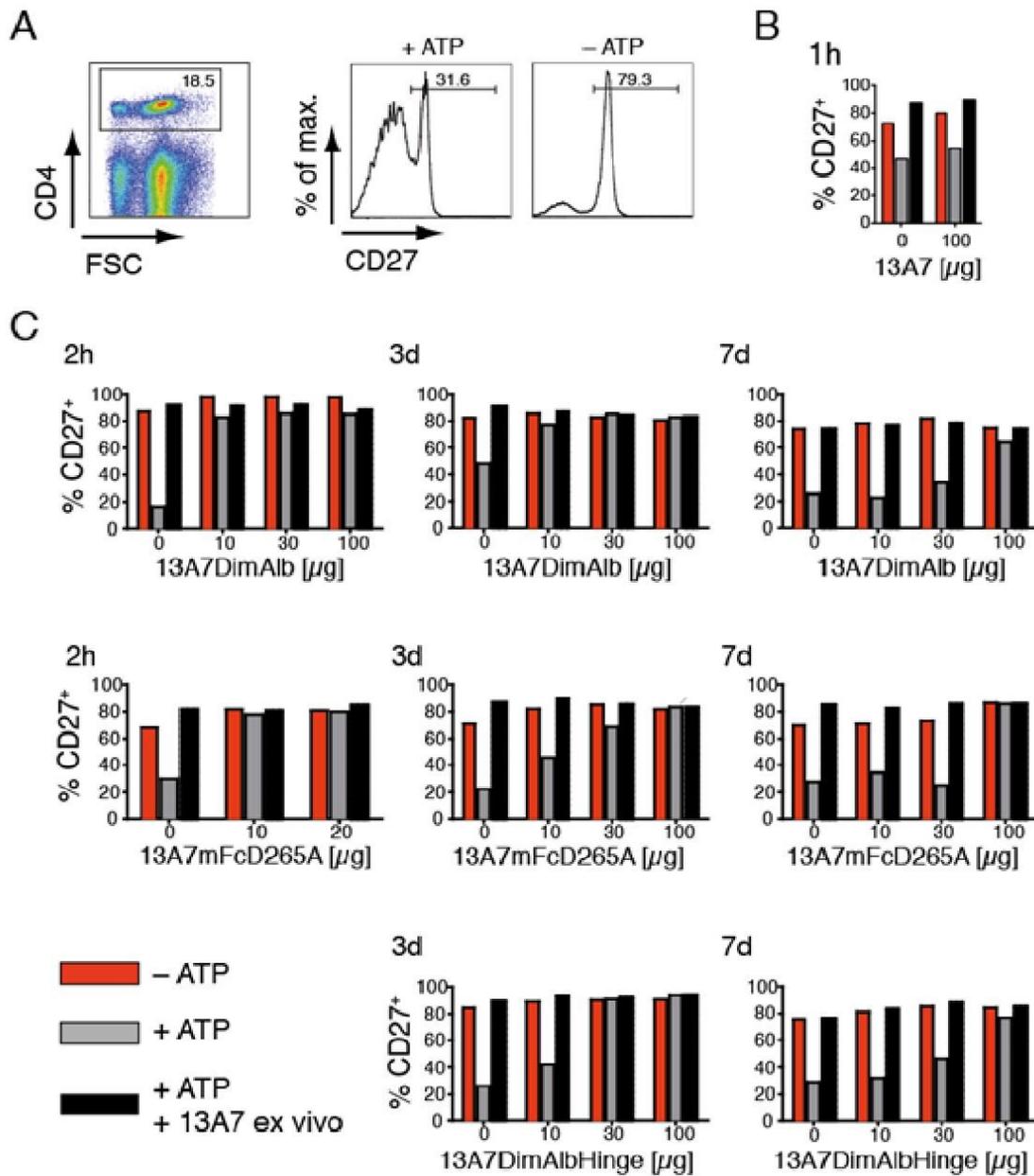
#### **3.3.1 Analyse der P2X7-Blockade auf T-Zellen in Lymphknoten und Milz nach Injektion von 13A7-Nanobodies**

Periphere Lymphknoten und die Milz wurden 2Std. bis 7 Tage nach Injektion der Nanobodies isoliert (siehe auch Abb.4). Die Untersuchung der P2X7-Blockade *in vivo* erfolgte durch *ex vivo* Stimulation der T-Zellen mit 500 $\mu$ M ATP und anschließender Analyse der CD27 Abspaltung von der Zelloberfläche dieser CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Abb.9) (Moon et al., 2006). Da sich die Ergebnisse der Lymphknoten und Milz T-Zellen Analyse nicht wesentlich voneinander unterscheiden, werden hier nur die Ergebnisse der Lymphknoten beschrieben und dargestellt. Zunächst wurde die Blockade von P2X7 auf T-Zellen durch das 13A7-Monomer 1Std. (1h) nach Injektion untersucht. Dieser frühe Zeitpunkt wurde gewählt, da monomere Nanobodies aufgrund ihrer geringen Größe bereits nach wenigen Stunden vollständig über die Niere ausgeschieden werden. Hier zeigte sich, dass selbst bei der Höchstdosis von 100 $\mu$ g 13A7 (i.v.) keine sichtbare Blockade der CD27-Abspaltung nach ATP-Stimulation festgestellt werden konnte. Jedoch war das 13A7-Monomer in der Lage bei *ex vivo* Zugabe die Abspaltung von CD27 zu verhindern (Abb.9B). Im Gegensatz dazu waren Injektionen von nur 10 $\mu$ g der dimeren Konstrukte 13A7DimAlb oder 13A7mFcD265A ausreichend um 2 Std. nach Injektion eine Blockade von P2X7 auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Lymphknoten *in vivo* zu bewirken. Eine höhere Dosis ergab mit diesen Konstrukten keine weitere Verbesserung der Blockade.

Wurde die P2X7-Blockade auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen von Lymphknoten 3 Tage nach Injektion untersucht, zeigte sich, dass 10 $\mu$ g 13A7DimAlb immer noch ausreichend waren, um die Abspaltung von CD27 nach der *ex vivo* Zugabe von ATP zu verhindern (Abb.9C).

13A7mFcD265A hingegen blockierte die CD27 Abspaltung erst ab einer Dosis von 30 – 100µg. Auch die Injektion von 13A7DimAlbHinge führte erst ab einer Dosis von 30µg zu einer vollständigen P2X7-Blockade auf Lymphknoten CD4<sup>+</sup> T-Zellen *in vivo*.

Die Analyse der *in vivo* Blockade von P2X7 auf den T-Zellen der Lymphknoten 7 Tage nach Injektion der 13A7-Nanobody-Konstrukte ergab, dass 30µg 13A7DimAlb, 13A7mFcD265A sowie 13A7dimAlbHinge nicht ausreichten, um P2X7 noch an Tag 7 nach der Injektion zu blockieren. Eine höhere Dosis von 100µg hingegen war ausreichend, um P2X7 auf T-Zellen der Lymphknoten bis zu einer Woche *in vivo* zu blockieren. Es konnte somit gezeigt werden, dass durch die Generierung von P2X7-spezifischen Nanobody Heterodimeren und Fc-Fusionsproteinen, jedoch nicht durch das Monomer, eine bis zu 7 Tagen andauernde *in vivo* Blockade von P2X7 auf T-Zellen in lymphatischen Organen möglich ist.



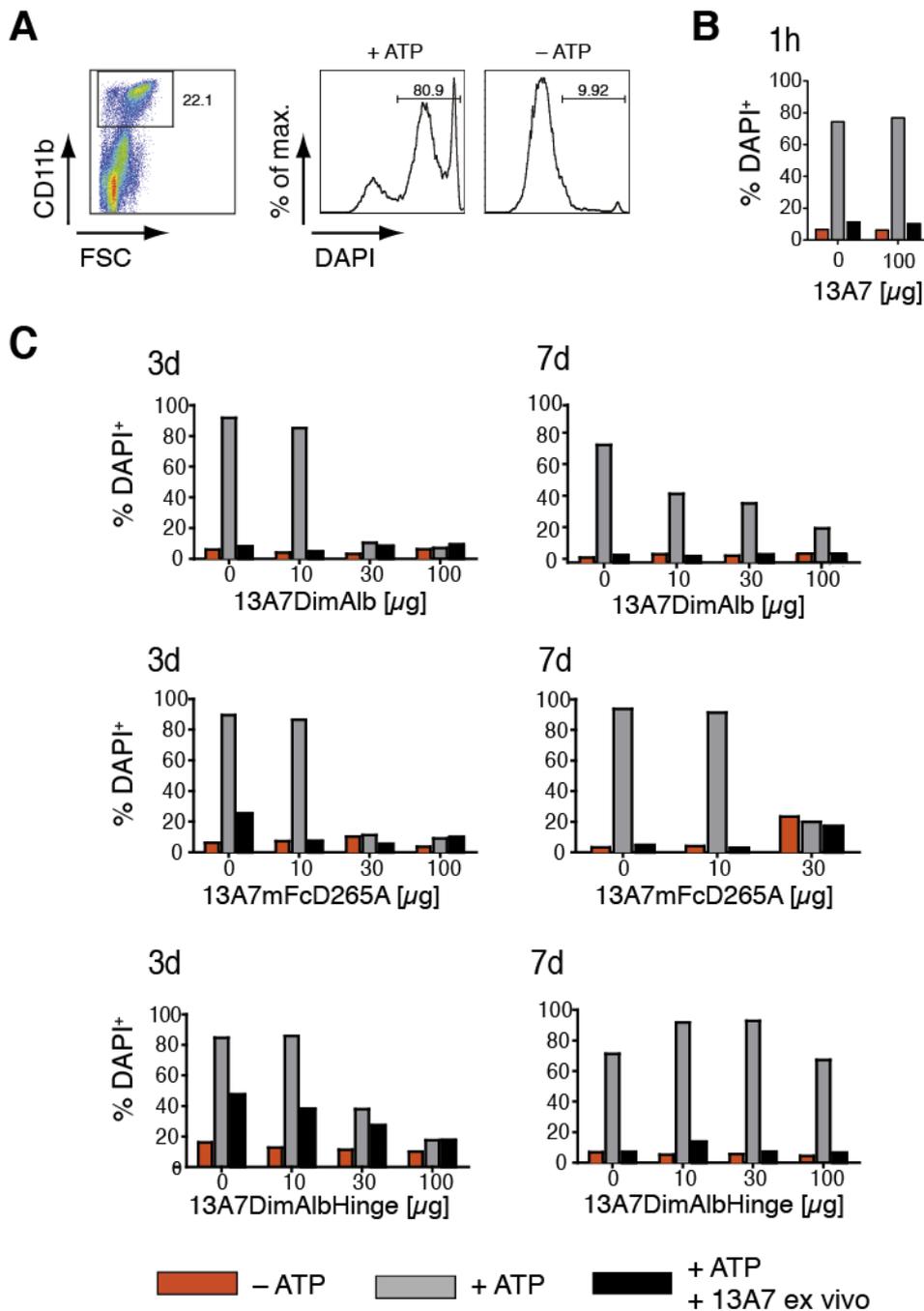
**Abb.9: Blockade von P2X7 auf T-Zellen im Lymphknoten nach Injektion von 13A7-Nanobodies *in vivo*.**

(A) Gating Strategie für CD4<sup>+</sup>T-Zellen. Nachweis von CD27 auf der Zelloberfläche nach Stimulation mit oder ohne 500μM ATP. (B) Injektion (i.v.) von 100 μg 13A7monomer und Analyse der CD27-Abspaltung 1Std (1h) nach Injektion. (C) Injektion von 0 – 100μg 13A7DimAlb, 13A7mFcD265A oder 13A7DimAlbHinge und Analyse der CD27 Abspaltung nach ATP-Stimulation. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden T-Zellen der peripheren Lymphknoten entnommen und *ex vivo* bei 37°C ohne ATP (rot) oder mit 250μM ATP (grau) stimuliert. Zudem wurde ein weiterer Ansatz mit 1μg des gespritzten Konstrukts *ex vivo* vorinkubiert und anschließend mit 250μM ATP inkubiert (schwarz), um die maximale P2X7-Blockade zu erreichen.

### 3.3.2 Analyse der P2X7-Blockade auf Makrophagen im Peritoneum nach Injektion von 13A7-Nanobodies

Neben lymphatischen Organen wie Lymphknoten und Milz wurde auch die *in vivo* Blockade von P2X7 auf Zellen aus nicht-lymphatischen Geweben untersucht. Hierfür wurden Makrophagen aus dem Peritoneum analysiert, die eine hohe P2X7-Expression aufweisen. Um zu untersuchen, wie schnell die verschiedenen 13A7-Nanobody-Konstrukte das Peritoneum erreichen und welche Dosis notwendig ist, um P2X7 auf den peritonealen Makrophagen *in vivo* zu blockieren, wurden bis zu 100µg 13A7, 13A7DimAlb, 13A7mFcD265A sowie 13A7DimAlbHinge intravenös in die Mäuse gespritzt. Die P2X7-Blockade auf peritoneale Makrophagen (CD11b<sup>+</sup>) wurde dann sowohl nach 3 als auch nach 7 Tage nach der Injektion untersucht. Hierfür wurde die Aufnahme von DAPI nach ATP-Stimulation (1,5mM) verwendet (Abb.10A) (Sun et al., 2013).

Ähnlich wie bei den T-Zellen der Lymphknoten (Abschnitt 3.3.1) konnte bei einer Injektion von 100µg 13A7-Monomer keine P2X7-Blockade auf den Makrophagen 1Std. nach Injektion detektiert werden (Abb.10B). Die Injektion von dimeren 13A7-Konstrukten hingegen führte zu einer nahezu vollständigen P2X7-Blockade *in vivo* auf den peritonealen Makrophagen. Bis zu 3 Tage nach Injektion wurde die P2X7-Inhibition durch die Nanobodies anhand der Blockade der DAPI-Aufnahme nach ATP-Stimulation sichtbar (Abb.10C). Wurde die Blockade von P2X7 auf den peritonealen Makrophagen 7 Tage nach Injektion untersucht, so unterschieden sich die dimeren 13A7-Konstrukte deutlich. So waren 100µg 13A7DimAlb nötig um P2X7 nahezu vollständig auf den peritonealen Makrophagen zu blockieren. Im Gegensatz dazu waren 30µg 13A7mFcD265A ausreichend, um einen ähnlichen Blockade-Effekt zu erzielen. Die Injektion von 13A7DimAlbHinge reichte jedoch selbst bei einer injizierten Dosis von 100µg nicht aus, um P2X7 *in vivo* bis zu 7 Tage lang zu blockieren.

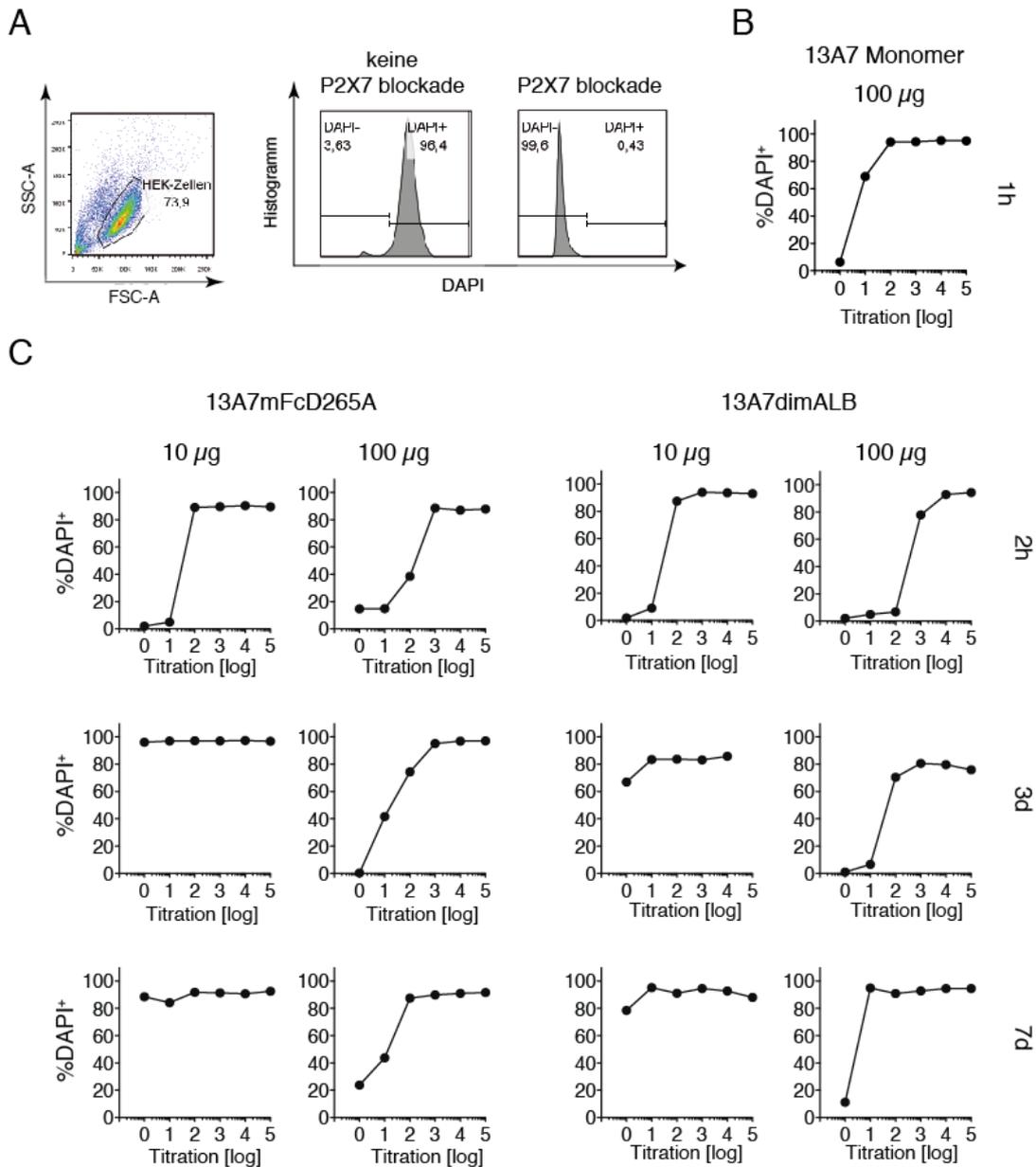


**Abb.10: Injektion von Nanobodies inhibiert P2X7 auf Makrophagen im Peritoneum.** (A) Gating Strategie für peritoneale Makrophagen und die Aufnahme von DAPI nach ATP-Stimulation (1,5mM). (B) Injektion von 100 $\mu$ g 13A7-Monomer und Analyse der P2X7-Blockade *in vivo*, 1Std. nach Injektion. (C) Injektion von 0 – 100 $\mu$ g 13A7DimAlb, 13A7mFcD265A oder 13A7DimAlbHinge und Analyse der DAPI-Aufnahme in CD11b+ peritoneale Makrophagen nach ATP-Stimulation. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Makrophagen *ex vivo* bei 37°C ohne ATP (rot) oder mit 1,5mM ATP (grau) stimuliert. Zudem wurde ein weiterer Ansatz mit 1 $\mu$ g des gespritzten Konstrukts *ex vivo* vorinkubiert und anschließend mit 1,5mM ATP inkubiert (schwarz) um die maximale P2X7-Blockade zu erreichen.

### 3.3.3 Nachweis von 13A7-Nanobodies im Serum von Mäusen nach Injektion

Um die Konzentration der injizierten 13A7-Nanobody-Konstrukte im Serum zu untersuchen, wurde von Mäusen 2Std., 3 Tage oder 7 Tage nach Nanobody Injektion Blut abgenommen, welches dann auf die Präsenz der 13A7-Konstrukte analysiert wurde. Hierfür wurden die gewonnenen Seren in 1:10 Verdünnungsschritten auf mP2X7-transfizierte HEK-Zellen gegeben. Enthielten die Seren P2X7-blockierende Nanobodies in ausreichender Konzentration, so blockierten sie die ATP-induzierte Aufnahme von DAPI in die mP2X7-HEK-Zellen (Sun et al., 2013) (Abb.11).

Die Untersuchungen in 3.3.1 und 3.3.2 ergaben, dass die Injektion des 13A7-Monomers nicht ausreichte, um die ATP-vermittelte Aktivierung von P2X7 auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen in den Lymphknoten oder auf CD11b<sup>+</sup> Makrophagen aus dem Peritoneum *ex vivo* zu verhindern. Jedoch ergab die Serumanalyse dieser Proben, dass 13A7 1Std. nach Injektion noch im Serum der injizierten Mäuse vorhanden war und bei einer Serumverdünnung von 1:1 (entspricht Log 0, unverdünnt) P2X7 auf den mP2X7-HEK-Zellen vollständig blockierte. Die 1:10 Verdünnung dieses Serums war hingegen nur noch für eine partielle P2X7-Blockade ausreichend (Abb.11B). Die Untersuchung der Seren aus den mit dimeren 13A7-Konstrukten gespritzten Mäusen ergab, dass das unverdünnte (entspricht Log 0) und das 1:10 verdünnte (entspricht Log 1) Serum der mit 10µg 13A7mFcD265A oder 13A7DimAlb behandelten Mäuse 2Std. nach Injektion ausreichte, um eine vollständige P2X7-Blockade auf den HEK-Zellen zu bewirken (Abb.11C). 3 und 7 Tage nach Injektion war jedoch nicht mehr ausreichend Nanobody im Serum vorhanden, um P2X7 auf mP2X7-HEK-Zellen zu blockieren. Wurden die Mäuse mit 100µg 13A7mFcD265A oder 13A7DimAlb behandelt, so waren die Konstrukte über einen längeren Zeitraum im Serum nachweisbar. So konnte das 2Std. nach Injektion entnommene Serum teilweise 1:100 (entspricht Log 2) verdünnt werden und es enthielt immer noch ausreichende Mengen des dimeren 13A7-Nanobodies um P2X7 auf den mP2X7-HEK-Zellen zu blockieren. 3 Tage nach Injektion war eine 1:1 Verdünnung (13A7mFcD265A) bzw. eine 1:10 Verdünnung (13A7DimAlb) der Seren ausreichend um P2X7 auf den mP2X7-HEK Zellen zu blockieren. Selbst an Tag 7 nach Injektion war im unverdünnten Serum der mit 100µg 13A7D265A und der mit 13A7DimAlb behandelten Mäuse noch genug 13A7-Nanobody vorhanden, um den P2X7 auf den mP2X7-HEK-Zellen nahezu vollständig zu blockieren.



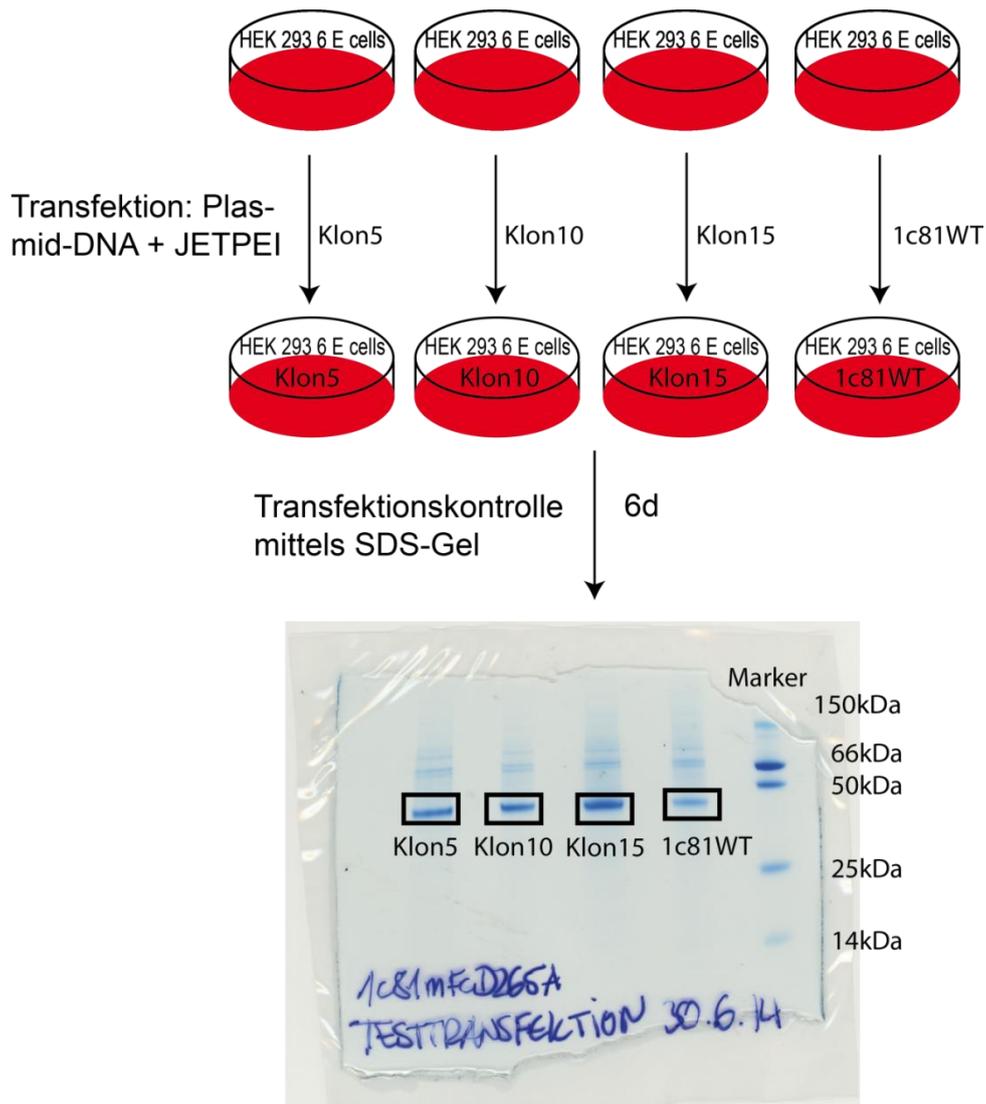
**Abb.11: Nachweis von 13A7-Nanobodies im Serum von i.v. injizierten Mäusen.** (A) Mit Maus P2X7 (mP2X7) stabil transfizierte HEK-Zellen wurden mit den Seren von 13A7-Nanobody behandelten Mäusen vorinkubiert und anschließend mit 1,5mM ATP stimuliert. Der prozentuale Anteil an DAPI-positiven (DAPI+) HEK-Zellen wurde anschließend durchflusszytometrisch bestimmt. (B) Serum von einer mit 100µg 13A7-Monomer behandelten Maus wurde 1Std (1h) nach Injektion entnommen, in 1:10 Schritten verdünnt und auf mP2X7 gegeben. Die Zellen wurden mit 1,5mM ATP stimuliert und die DAPI-Aufnahme wurde durchflusszytometrisch gemessen. (C) Seren von mit 10µg oder 100µg 13A7mFcD265A oder 13A7DimAlb injizierten Mäusen wurde 2 Std. (2h), 3 Tage (3d) oder 7 Tage (7d) nach Injektion in 1:10 Schritten verdünnt und auf mP2X7 gegeben, die Zellen wurden mit 1,5mM ATP stimuliert und die DAPI-Aufnahme durchflusszytometrisch gemessen.

### **3.4 Klonierung und Untersuchung von weiteren P2X7-spezifischen Nanobody Konstrukten**

Der dritte Teil dieser Doktorarbeit behandelt die Generierung von 1c81mFcD265A Fusionsproteinen mit verändertem Bindungsverhalten zu Fc-Rezeptoren, optimiert für den Einsatz *in vivo*. Zudem wurden die neu generierten 1c81mFcD265A Nanobodies *in vitro* pharmakologisch charakterisiert.

#### **3.4.1 Generierung von 1c81-Fc-Fusionsproteinen mit D265A Mutation**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neue Fc-Fusionsprotein-Varianten des P2X7-spezifischen Klons 1c81 generiert, die aufgrund einer Mutation (D265A) in der CH2-Domäne des Fc-Teils nicht mehr mit Fc-Rezeptoren interagieren können (1c81mFcD265A) (Baudino et al., 2008). Als Ausgangsvektor wurde das Plasmid FS#477 (AG Koch-Nolte, UKE) verwendet. Dieses enthielt die Sequenzen für den Nanobody 1c81 fusioniert an den unmutierten, murinen IgG-Fc-Teil (mIgG2-Fc-WT). mIgG2-Fc-WT wurde mittels Restriktionsenzymen herausgeschnitten und durch eine mIgG-Fc Sequenz mit der Mutation D265A (mIgG-Fc-D265A) aus dem Plasmid FS#507 (AG Koch-Nolte, UKE) ersetzt. Die so generierten neuen Konstrukte wurden in E.coli Bakterien vermehrt und 22 Kolonien mittels Sequenzierung auf die korrekte Insertion hin analysiert. Hier zeigte sich, dass 20 der 22 analysierten Klone die korrekt eingebaute Gensequenz enthielten. Klon 5, 10 und 15 wurden anschließend für eine Testtransfektion in HEK-Zellen ausgewählt. In 10ml HEK-Zell-Überstand der Testtransfektion betrug die 1c81-mFcD265A Konzentration ca. 5 – 10mg/ml. Die Konzentration der ebenfalls exprimierten ursprünglichen 1c81-mFcWT Variante betrug 2,5mg/ml (Abb.12).

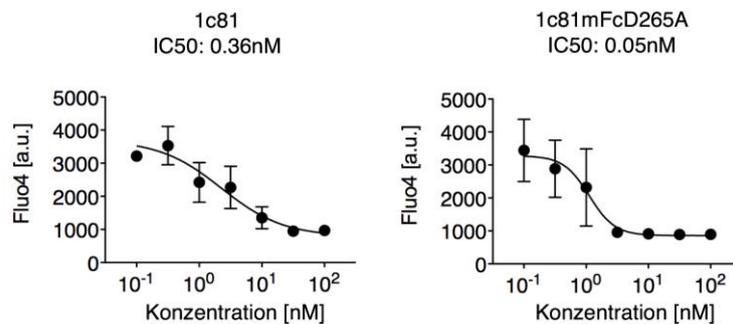


**Abb.12: Umklonierung und Testexpression des neuen 1c81mFcD265A-Konstrukts.** Je 5µg Plasmid DNA von Klon 5, 10, 15 und des 1c81mFcGWT wurden mit dem Transfektionsreagenz JetPEI und Transfektionsmedium gemischt. Dieses Gemisch wurde auf HEK-293 6E-Zellen gegeben und für 24Std. im Brutschrank inkubiert. Einen Tag nach Transfektion wurden die Zellen mit Feeding-Medium versorgt und für weitere 5 Tage im Brutschrank belassen. Am 6. Tag wurde der Zellüberstand abzentrifugiert und eine SDS-Gelkontrolle zur Überprüfung des Transfektionserfolgs durchgeführt.

### 3.4.2 Untersuchung der Blockierenden Eigenschaften von 1c81mFcD265A in vitro

Um die blockierenden Eigenschaften des neu generierte 1c81mFcD265A Nanobodies zu evaluieren, wurde, wie zuvor für die 13A7-Konstrukte, der Calcium-Einstrom in mP2X7-transfizierte HEK-Zellen nach ATP-Stimulation untersucht. Hierzu wurden die HEK-Zellen

mit dem Calciumsensor Fluo4-AM beladen. Anschließend wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von 1c81-Monomer oder 1c81mFcD265A (Höchstkonzentration 100nM) vorinkubiert. Die Zellen wurden dann mit 1.5mM ATP stimuliert und der calcium-vermittelte Anstieg in der Fluo4 Fluoreszenz abschließend am Fluoreszenzreader gemessen. Es zeigte sich, wie bereits zuvor bei den 13A7-Konstrukten, dass die dimere Form von 1c81 (1c81mFcD265A) P2X7 effektiver blockiert als das 1c81 Monomer (Abb.13). Vergleich man jedoch die IC50 Werte der 1c81- und 13A7-Konstrukte, so fiel auf, dass die 1c81-Konstrukte P2X7 schon bei deutlich niedrigeren Konzentrationen inhibierten.



**Abb.13: 1c81-Nanobody-Konstrukte blockieren dosisabhängig den Einstrom von Calcium.** mP2X7-HEK-Zellen wurden mit Fluo4-AM beladen und mit steigenden Dosen von 1c81 oder 1c81mFcD265A inkubiert (Höchstkonzentration 100nM). Anschließend wurden die Zellen mit 1,5mM ATP stimuliert und die Fluo4 Fluoreszenz wurde im Victor III Fluoreszenzreader gemessen. (n = 3 pro Messpunkt, Fehlerbalken: Standardabweichung).

## 4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die pharmakologische *in vitro* und *in vivo* Charakterisierung von P2X7-blockierenden 13A7-Nanobody-Konstrukten im Hinblick auf ihre Anwendung als Therapeutika in Entzündungsmodellen der Maus. Im Rahmen dieser Arbeit wurden neue P2X7-spezifische Nanobody-Formate generiert und erfolgreich in HEK-Zellen produziert. In *in vitro* Versuchen an mP2X7-transfizierten HEK-Zellen konnte gezeigt werden, dass dimere 13A7-Konstrukte in der Lage waren die P2X7-vermittelte Aufnahme von DAPI sowie den Einstrom von niedrigen Dosen an Calcium-Ionen effektiver zu inhibieren als die monomeren 13A7-Konstrukte. Zudem konnte gezeigt werden, dass dimere 13A7-Konstrukte nach intravenöser Injektion den P2X7-Rezeptor *in vivo* für einen Zeitraum von 2Std. bis 7 Tage nach der Injektion blockierten.

In den Versuchen an mP2X7-HEK-Zellen konnte gezeigt werden, dass die 13A7-Nanobody-Konstrukte den P2X7-Kanal *in vitro* bei Konzentrationen im niedrigen nanomolaren Bereich blockierten. Dies ist ein deutlicher Fortschritt, da bereits existierende *small molecule inhibitors* (SMI) gegen P2X7 weit höhere Konzentrationen benötigen, um P2X7 zu blockieren (Bartlett, Stokes, & Sluyter, 2014). Hinzu kommt, dass Nanobodies, ähnlich wie konventionelle Antikörper, eine hohe Spezifität gegenüber ihrem Zielmolekül aufweisen. So haben Versuche von Kollegen gezeigt, dass 13A7 nicht an die strukturell verwandten Maus-P2X1 oder P2X4-Rezeptoren und auch nicht an den humanen-P2X7 gebunden haben (Welbeck Danquah et al., 2016). Gegenwärtig verwendete SMIs zur P2X7-Blockade weisen hingegen durchaus auch blockierende Effekte auf andere membranständige P2X-Rezeptoren oder assoziierte Membranproteine auf. Brilliant Blue G (BBG), ein SMI, wird beispielsweise sowohl *in vitro* als auch *in vivo* als P2X7-Antagonist eingesetzt. Studien haben aber gezeigt, dass BBG ebenfalls den P2X7-assoziierten Pannexin 1 Kanal inhibiert (Qiu & Dahl, 2009). Periodat-oxidiertes ATP (oATP) und Pyridoxal-Phosphat-6-Azophenyl-2-4-Disulfonsäure (PPADS) werden ähnlich wie BBG als P2X7-Inhibitoren eingesetzt. Diese SMIs binden aber im Gegensatz zum P2X7-spezifischen Nanobody 13A7 auch an andere Rezeptoren der P2X-Familie (Evans et al., 1995; Murgia, Hanau, Pizzo, Rippa, & Di Virgilio, 1993). Hinzu kommt, dass niedermolekulare Inhibitoren oder deren Metabolite oft toxische Nebenwirkungen *in vivo* hervorrufen können (Guile et al., 2009) und somit nur begrenzt im Tiermodell einsetzbar sind. Für den therapeutischen Einsatz im Menschen sind sie bisher deshalb nicht geeignet. P2X7-blockierende Nanobodies stellen somit eine interessante

Alternative zur *in vivo* Blockade von P2X7 dar. Ähnlich wie bei dem *in vivo* Einsatz von monoklonalen Antikörpern stellte sich die Frage nach deren Immunogenität und der Bildung von neutralisierenden Antikörpern gegen *in vivo* applizierte Nanobodies. Die Bildung von neutralisierenden Antikörpern gegen monoklonale Antikörper stellt nach wie vor ein großes Problem bei der Antikörpertherapie dar (Harding, Stickler, Razo, & DuBridge). Erfreulicherweise konnten Studien mit Nanobodies aber bereits zeigen, dass diese nur eine sehr geringe Immunogenität aufweisen und somit nur sehr selten neutralisierende anti-Nanobody-Antikörper generiert werden (Serge Muyldermans, 2013).

Interessanterweise gibt es bislang keine monoklonalen Antikörper, die P2X7 effektiv blockieren. Der gegen human-P2X7 gerichtete Antikörperklon L4 ist z.B. nur partiell in der Lage P2X7 zu blockieren (Chessell et al., 2005) (Buell et al., 1998). Der kürzlich beschriebene Klon 1F11 gegen Maus-P2X7 ist in der Lage P2X7 auf Mastzellen zu blockieren, jedoch haben Versuche aus unserem Labor gezeigt, dass die P2X7-Blockade auf T-Zellen im direkten Vergleich zu dimerem 13A7 nur sehr schwach ist (Welbeck Danquah et al., 2016). Der Vorteil der Nanobodies gegenüber monoklonalen Antikörpern liegt hierbei vermutlich in der Struktur der antigenbindenden CDR3-Region. Konventionelle Antikörper binden in der Regel an planare Epitope auf dem Antigen und sind somit nicht in der Lage die tief liegenden Bindungsstellen an Ionenkanälen zu blockieren (Wesolowski et al., 2009). Nanobodies hingegen können mit ihrer finger-förmig ausgestülpten CDR3-Region in molekulare Vertiefungen binden und stellen somit potentiell potentere Antagonisten von liganden-gesteuerten Ionenkanälen dar (Wesolowski et al., 2009).

Die unterschiedlichen Formate der hier *in vivo* getesteten Nanobodies bringen Vor- und Nachteile mit sich. Die monomeren Konstrukte liegen mit einer Größe von ca. 15kDa unter der Nierenfiltrationsgrenze und können somit schnell wieder ausgeschieden werden (Deen, Lazzara, & Myers, 2001). Dieser Effekt könnte dazu beigetragen haben, dass das monomere 13A7-Konstrukt *in vivo* keine effektive Blockade von P2X7 zeigte. Jedoch haben die Analysen des Serums von 13A7 behandelten Mäusen die Präsenz von 13A7 im Serum 1Std. nach der Injektion eindeutig nachgewiesen. Eine mögliche Erklärung könnte somit auch sein, dass an P2X7-gebundenes, monomeres 13A7 während der Aufbereitung der Zellen aus den Lymphknoten und dem Peritoneum verloren geht und somit keinen blockierenden Effekt auf P2X7 während der *ex vivo* ATP-Stimulation ausüben konnte. Spätere Experimente von Kollegen haben in der Tat gezeigt, dass monomeres 13A7 durch mehrfaches Waschen der

Zellen von der Zelloberfläche entfernt werden kann und die Zellen wieder auf ATP-Stimulation reagieren (Welbeck Danquah et al., 2016) . In dieser Arbeit nicht dargestellte Versuche mit neuen P2X7-spezifischen Klonen (1c81) konnten jedoch zeigen, dass monomeres 1c81 30min. nach intravenöser Injektion, P2X7 sowohl auf T-Zellen als auch auf peritonealen Makrophagen blockieren kann. Der Grund hierfür liegt vermutlich in der höheren Affinität von monomerem 1c81 im Vergleich zu monomerem 13A7 gegenüber P2X7 (siehe auch 3.3.2). Die schnelle Elimination der monomeren Nanobodies kann auch als Vorteil genutzt werden. Beispielsweise können radioaktiv-markierte Nanobodies in bildgebenden Verfahren eingesetzt werden. Vaneycken et al. konnten den Vorteil von radioisotop-markierten Nanobodies gegenüber radioisotop-gekoppelten monoklonale Antikörper (mAbs) in der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) aufzeigen. Werden mAbs an Radioisotope gekoppelt, haben sie eine Verweildauer von Tagen bis Wochen im Organismus von Mäusen. Außerdem müssen sie an langlebige Radioisotope gekoppelt werden und erbringen diagnostisch verwertbare Signale erst nach 2 bis 4 Tagen. Hingegen können radioaktiv-markierte Nanobodies mit kurzlebigen Radioisotopen fusioniert werden und schon nach 1 bis 3Std. gut detektierbare Signale vermitteln. Hierdurch wird der Organismus weniger Strahlenbelastung ausgesetzt, da die Nanobodies schneller ausgeschieden werden (Vaneycken et al., 2011).

Anhand der heterotrimeren Konstrukte konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Nanobodies durch die Dimerisierung eine höhere Avidität an ihr Zielmolekül erreichen (S. Muyldermans, 2001). Dies zeigte sich in einer niedrigen benötigten Dosierungen zum Erzielen des Blockadeeffekts *in vivo*. Andererseits konnte demonstriert werden, dass die Zirkulationszeit im Körper durch die Fusion eines 13A7-Dimers mit einem Anti-Albumin-Nanobody (Alb) dosisabhängig bis auf eine Woche verlängert werden konnte. Diese Konstrukte liegen mit einem Molekulargewicht von 45kDa immer noch unter der Filtrationsgrenze der Niere. Dass ihre Zirkulationszeit im Organismus tatsächlich durch die Bindung des Nanobodies an Serumalbumin verlängert werden kann, wurde in einer Studie von Tijink et al. gezeigt. In dieser Studie führte die Fusion eines Nanobody-Dimers ( $\alpha$ EGFR- $\alpha$ EGFR) mit einem Anti-Albumin-Nanobody (Alb) auch zu einer verlängerten Zirkulationszeit im Organismus von Mäusen (Tijink et al., 2008). Außerdem verglichen sie das Potential des Nanobodies gegenüber des bereits zur Therapie am Menschen eingesetzten mAbs Cetuximab. Der in dieser Studie eingesetzte heterotrimere Nanobody  $\alpha$ EGFR- $\alpha$ EGFR-

Alb konnte neben einer vergleichbaren Verweildauer, auch eine schnellere und tiefere Tumorpenetration zeigen als der mAb Cetuximab (Tijink et al., 2008). Coppieters et al. machten die Fusion eines dimeren Anti-TNF-Nanobodies an einen Anti-Albumin-Nanobody sogar dafür verantwortlich, dass seine Effektivität in der TNF-Blockade stieg, da Albumin in rheumatischen Entzündungsherden akkumulierte. Dieser Nanobody zeigte in seiner Wirkung dadurch effektivere Ergebnisse als die ebenfalls bereits zur Therapie zugelassenen mAbs Infliximab und Adalimumab (Coppieters et al., 2006).

Eine prolongierte Verweildauer im Organismus konnte auch mit dem Fc-Konstrukt erzielt werden. Dieses Konstrukt (13A7mFcD265A) liegt mit einem Molekulargewicht von 80kDa über der Nierenfiltrationsgrenze und verbleibt somit länger im Organismus. Außerdem führt die Punktmutation D265A in der CH2-Domäne des Fc-Teils zu einer geringeren Affinität zu Fc-Rezeptoren, wodurch die Elimination durch phagozytierende Zellen erschwert wird und es somit ebenfalls zu einer Verlängerung der *in vivo* Halbwertszeit kommt (Baudino L, 2008). Mit diesen Nanobodies konnte ebenfalls in dieser Arbeit eine P2X7-Blockade bis zu 7 Tagen erreicht werden. Die Fusion von Nanobodies mit Fc-Teilen konventioneller Antikörper bietet zudem den Vorteil, dass die Fc-Region direkt mit einem sekundären Antikörper detektiert werden und somit beispielsweise gut in immunhistochemischen Untersuchungen nachgewiesen werden kann (Wesolowski et al., 2009).

Aufgrund ihrer vielseitigen Eigenschaften stellen Nanobodies geeignete Werkzeuge dar, um sie therapeutisch in Krankheitsmodellen einzusetzen. Bisher wurde die Rolle des P2X7-Kanals in verschiedenen autoimmunen aber auch neurodegenerativen Krankheitsmodellen gezeigt (Friedle, Curet, & Watters, 2010). Unser Labor konnte die P2X7-blockierenden Nanobodies mit Hilfe der Firma Washington Biotechnology Inc. in einem Kontaktdermatitismodell testen. Durch wiederholte Gaben der Nanobodies konnte in diesem Krankheitsmodell gezeigt werden, dass eine allergische Reaktion vom Spättyp durch die Blockade P2X7-gesteuerter Entzündungsprozesse verhindert werden kann. Dies äußerte sich durch eine reduzierte Schwellung und verminderte Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen an der Kontaktstelle des Allergens. In ihrer Studie an P2X7-defizienten Mäusen haben Weber et al. gezeigt, dass P2X7 auf dendritischen Zellen essentiell für die Etablierung der Immunreaktion gegen das Kontaktallergen ist (Weber et al., 2010). In dieser Studie wurden auch SMIs gegen P2X7 eingesetzt (KN-62). Mit Hilfe der P2X7-spezifischen Nanobodies besteht nun die Möglichkeit, diesen Mechanismus in neuen Experimenten zu

überprüfen. Interessanterweise haben erste Versuch diesbezüglich gezeigt, dass eine einmalige Gabe von 13A7DimAlb vor der Sensibilisierung nicht auszureichen schien, um Sensibilisierung gegenüber dem Kontaktallergen zu verhindern (Welbeck Danquah et al., 2016). Auch Barberà-Cremades et al. konnten zeigen, dass P2X7 in Entzündungsprozesse involviert ist. Da P2X7-Aktivierung durch DAMP wie ATP zur Freisetzung von Phospholipase A2 führt (Andrei et al., 2004) und diese wiederum in der Lage sind aus Phospholipiden Arachnoidonsäure zu erzeugen, kommt es durch Einfluss der Cyclooxygenase 2 (COX 2) zur Entstehung von Prostaglandin E2 (PGE 2). PGE2 ist ein wichtiger Mediator von Entzündung, Fieber und Schmerz (Barbera-Cremades et al., 2012). Da nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR) als Standardmedikamente zur Blockade der COX und damit gegen entzündliche Prozesse mit erheblichen Nebenwirkungen einhergehen können, kann es von Vorteil sein, die Signalkaskade, die zur Entstehung der Entzündung führt, durch gezielte P2X7-Antagonisten, wie die 13A7-Nanobodies, schon bei ihrem Beginn zu unterbinden (Bartlett et al., 2014).

Auch in neurodegenerativen Prozessen konnte dem P2X7-Rezeptor eine entscheidende Rolle zugewiesen werden. Durch Reperfusion nach einem ischämischen Schlaganfall kommt es zu einer massiven Einschwemmung von Immunzellen (Gelderblom et al., 2009). Diese treffen auf ein ATP-reiches Milieu, erzeugt durch die steigende extrazelluläre ATP-Konzentration bei nekrotischen Prozessen. Durch das ATP können P2X7-Rezeptoren auf den infiltrierenden und residenten Immunzellen aktiviert werden und besonders in Makrophagen und Mikroglia zur Freisetzung von proinflammatorischem IL1- $\beta$  führen. Die ablaufenden Entzündungsprozesse können somit wiederum zur Vergrößerung des Infarktareals beitragen (Iadecola & Anrather, 2011). Es konnte gezeigt werden, dass die Antagonisierung des P2X7-Rezeptors, mittels des small molecule inhibitors PPADS, die ischämische Infarktgröße im middle cerebral artery occlusion (MCAO)- Modell bei Ratten reduzieren kann (Lämmer et al., 2006). Auch Brilliant Blue G (BBG) erwies sich als reduzierend auf den Gewebeschaden nach ischämischem Schlaganfall (Arbeloa et al., 2012). Der nächste logische Schritt zur Evaluation von P2X7 als therapeutisches Ziel im ischämischen Schlaganfall wäre der Einsatz der in dieser Arbeit charakterisierten P2X7-blockierenden Nanobodies, da PPADS und BBG wie bereits erwähnt, auch andere Membranproteine in ihrer Funktion beeinträchtigen. Jedoch bildet die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke nach wie vor eine große Herausforderung für antikörperbasierte Therapeutika (B. Rissiek et al., 2014). Die Weiterentwicklung und

Optimierung von P2X7-blockierenden Nanobodies bildet somit ein vielversprechendes Konzept zur Behandlung von inflammatorischen, autoimmunen und neurodegenerativen Krankheitsbildern.

## Zusammenfassung

Das Immunsystem reagiert auf körperfremde Pathogene wie Bakterien oder Viren mit dem Auslösen einer Immunantwort. Zudem ist es in der Lage auf sterile Gewebeschäden zu reagieren. Die Freisetzung von intrazellulärem Adenosintriphosphat (ATP) in den extrazellulären Raum, sei es im Rahmen einer Infektion oder traumatischer Gewebeschäden, spielt dabei eine zentrale Rolle als Gefahrensignal für das Immunsystem. ATP ist ein Ligand für Purinrezeptoren, wie den P2X7-Rezeptor, welcher auf zellulärer Ebene die Freisetzung des proinflammatorischen Zytokins Interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) bewirkt. Um P2X7-vermittelte Entzündungsprozesse gezielt therapeutisch unterdrücken zu können, waren in der AG Nolte am Institut für Immunologie des UKE Einzeldomänenantikörper, auch Nanobodies genannt, gegen diesen Ionenkanal bereits entwickelt worden (W. Danquah et al., 2016; W Danquah, 2012). Nanobodies sind Antikörperfragmente, die als kleinste antigenbindende Einheit fungieren. Aufgrund ihrer geringen Größe und außergewöhnlichen Struktur haben sie die Fähigkeit tief in Gewebe einzudringen und sind in der Lage, an Strukturen zu binden, die für konventionelle Antikörper schwer erreichbar sind. Sie können somit die Funktion von Enzymen oder liganden-gesteuerten Ionenkanälen, wie dem P2X7-Rezeptor, inhibieren oder verstärken.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die pharmakologischen Eigenschaften von verschiedenen Formaten des P2X7-blockierenden Nanobodies 13A7 *in vitro* und *in vivo* untersucht. Hierbei wurden 13A7-Monomere, Heterotrimere bestehend aus zwei 13A7-Monomeren und einem anti-Albumin-Nanobody (genannt 13A7dimAlb) sowie 13A7-Fc-Fusionsproteine (genannt 13A7mFc) verglichen. Anfängliche Versuche mit P2X7-exprimierenden HEK Zellen haben dabei gezeigt, dass dimere 13A7-Formate P2X7 *in vitro* effektiver inhibieren als monomere 13A7-Nanobodies. *In vivo*, nach intravenöser Injektion, zeigten ebenfalls die dimeren Konstrukte deutlich potentere Blockadeigenschaften im Vergleich zu dem Monomer. So führte beispielsweise eine einmalige Injektion von 100 $\mu$ g 13dimAlb oder 13A7mFc zu einer bis zu 7 Tagen dauernden P2X7-Blockade auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen der Milz und auf Makrophagen aus dem Peritoneum. Beide Konstrukte waren zudem noch 7 Tage nach Injektion im Serum nachweisbar. Neben der Charakterisierung der 13A7-Konstrukte wurde zudem ein Fc-Fusionsprotein eines weiteren P2X7-blockierenden Nanobody-Klons (1c81) generiert und *in vitro* bezüglich der P2X7-Blockadeigenschaften untersucht. Auch hier zeigte die Dimerisierung eine Verbesserung der Blockadeigenschaften im Rahmen von *in vitro*

Untersuchungen. Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit liefern somit wichtige Erkenntnisse für weitere *in vivo* Anwendungen wie z.B. für die Evaluation der P2X7-Nanobodies in Entzündungsmausmodellen. Zum anderen wurden bereits verfügbare Nanobodies weiterentwickelt um sie für die zukünftige *in vivo* Anwendung zu optimieren.

## Summary

The immune system responds to body-borne pathogens such as bacteria or viruses with triggering of an immune response. In addition, the immunsystem is able to react to sterile tissue damage. Furthermore the release of intracellular adenosine triphosphate (ATP) into the extracellular space, whether as a result of infection or traumatic tissue damage, plays a central role as a danger signal for the immune system. ATP is a ligand for purine receptors, such as the P2X7-receptor, which at the cellular level releases the pro-inflammatory cytokine interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ). In order to be able to suppress P2X7-mediated inflammatory processes therapeutically, single-domain antibodies, also known as nanobodies, had been developed against this ion channel previously in the Nolte lab at the Institute of Immunology of the UKE (W. Danquah et al., 2016; W Danquah, 2012). Nanobodies are antibody fragments which function as the smallest antigen binding unit. Due to their small size and exceptional structure, they have the ability to penetrate deep into tissues and are capable of binding to structures that are difficult to reach for conventional antibodies. Therefore they may inhibit or enhance the function of enzymes or ligand-controlled ion channels, e.g. P2X7. Within the scope of these studies, the pharmacological properties of various formats of P2X7-blocking nanobodies 13A7 were investigated *in vitro* as well as *in vivo*. In this certain study, 13A7-monomers, heterotrimers consisting of two 13A7-monomers and one anti-albumin-nanobody (named 13A7dimAlb), as well as 13A7-Fc-fusion proteins (named 13A7mFc) were compared. Initial experiments with P2X7-expressing HEK-cells have shown that dimeric 13A7 formats inhibit P2X7 *in vitro* more effectively than monomeric 13A7-nanobodies. *In vivo*, after intravenous injection, the dimeric constructs have also shown significantly more potent blockade properties compared to the monomer. For example, a single injection of 100 $\mu$ g 13dimAlb or 13A7mFc resulted in a P2X7-blockade lasting up to seven days on CD4<sup>+</sup> T-cells of the spleen and on macrophages from the peritoneum. Both constructs have been also detectable seven

days after injection in the serum. In addition to the characterization of the 13A7-constructs, an Fc-fusion protein of a further P2X7-blocking nanobody-clone (1c81) was generated and tested *in vitro* for P2X7-blockade properties. Here too, the dimerization has shown an improvement in the blocking properties in the context of *in vitro* investigation. The results of this dissertation thus provide important insights for further *in vivo* applications, e.g. for the evaluation of P2X7-nanobodies in inflammation models. Furthermore, already available nanobodies were optimized to for future *in vivo* application.

## Abkürzungsverzeichnis

ALB	Albumin-spezifischer-Nanobody
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovine Serum Albumin
Ca.	Circa
CDR	Complementarity determining region
CH	konstante Domäne der schweren Kette eines Antikörpers
CL	konstante Domäne der leichten Kette eines Antikörpers
COX-2	Cyclooxygenase 2
D	Day/days
DAMP	danger-associated molecular pattern
Dim-Alb	Heterotrimer Nb, bestehend aus zwei anti-P2X7 Nbs und einem anti-Albumin-Nb
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNFB	1-fluoro-2,4-dinitrobenzol
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli Bakterien
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Fab-Fragment	antigenbindendes Fragment
Fc-Fragment	krisallisierbares Fragment
FCS	Fetales Kälberserum

H	Hour
His	Hexahistidin-Tag
HMGB1	High mobility group box 1 Protein
IC50	mittlere inhibitorische Konzentration
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
LN	Lymphknoten
LPS	Lipopolysaccharid
MFI	mittleren Fluoreszenzintensität
Min.	Minute/Minuten
mIgG-WT-Fc	maus-IgG-Wildtyp Fc-Teil
mP2X7	Maus-P2X7-Ionenkanal
mP2X7-HEK-Zellen	Maus-P2X7-Rezeptor stabil transfizierte HEK-Zellen
Nb	Nanobody
NEAA	nicht essentielle Aminosäuren
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NRS	Normal Rattenserum
P2X7	P2X7-Rezeptor
PAL	Peritoneallavage
PAMP	pathogen-associated molecular patterns

PBS	Phosphate buffered saline
PRR	pathogen-erkennende Rezeptoren
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, <i>Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese</i>
SIMs	small molecule inhibitors
Std.	Stunde/Stunden
VH	variable Domäne der schweren Kette eines Antikörpers
VHH	variable domain of camelid heavy chain antibody
VL	variable Domäne der leichten Kette eines Antikörpers
VNAR	variable domain of the shark new antigen receptor
z.B.	zum Beispiel

### **Liste der aus der Dissertation hervorgegangenen Vorveröffentlichungen**

Danquah, W., Catherine, M.-S., Rissiek, B., Pinto, C., Arnau, S.-P., Amadi, M., ... Friedrich, K.-N. (2016). Nanobodies that block gating of the P2X7 ion channel ameliorate inflammation. *Science Translational Medicine*, 8(366). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf8463>

## Literaturverzeichnis

- An, Z. (2010). Monoclonal antibodies - a proven and rapidly expanding therapeutic modality for human diseases. *Protein and Cell*, 1(4), 319–330. <https://doi.org/10.1007/s13238-010-0052-8>
- Andrei, C., Margiocco, P., Poggi, A., Lotti, L. V, Torrissi, M. R., & Rubartelli, A. (2004). Phospholipases C and A2 control lysosome-mediated IL-1 beta secretion: Implications for inflammatory processes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(26), 9745–50. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308558101>
- Arbeloa, J., Pérez-Samartín, A., Gottlieb, M., & Matute, C. (2012). P2X7 receptor blockade prevents ATP excitotoxicity in neurons and reduces brain damage after ischemia. *Neurobiology of Disease*, 45(3), 954–961. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.12.014>
- Barbera-Cremades, M., Baroja-Mazo, a., Gomez, a. I., Machado, F., Di Virgilio, F., & Pelegrin, P. (2012). P2X7 receptor-stimulation causes fever via PGE2 and IL-1 release. *The FASEB Journal*, 26(7), 2951–2962. <https://doi.org/10.1096/fj.12-205765>
- Bartlett, R., Stokes, L., & Sluyter, R. (2014). The P2X7 Receptor Channel: Recent Developments and the Use of P2X7 Antagonists in Models of Disease. *Pharmacological Reviews*, 66(3), 638–675. <https://doi.org/10.1124/pr.113.008003>
- Baudino, L., Shinohara, Y., Nimmerjahn, F., Furukawa, J., Nakata, M., Martínez-Soria, E., ... Izui, S. (2008). Crucial role of aspartic acid at position 265 in the CH2 domain for murine IgG2a and IgG2b Fc-associated effector functions. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 181(9), 6664–6669. <https://doi.org/10.1093/infdis/jin111> [pii]
- Behring, E. & Kitasato, S. (1890). Ueber das Zustandekommen der Diphtherie-Immunität und der Tetanus-Immunität bei Thieren. *Dtsch. Med. Wschr*, 16, 1113–1114.
- Berson, S. A., & Yalow, R. S. (1968). Radioimmunoassay of ACTH in plasma. *Journal of Clinical Investigation*, 47(12), 2725–2751. <https://doi.org/10.1172/JCI105955>
- Bianchi, M. E. (2007). DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *Journal of Leukocyte Biology*, 81(1), 1–5. <https://doi.org/10.1189/jlb.0306164>
- Buell, G., Chessell, I. P., Michel, a D., Collo, G., Salazzo, M., Herren, S., ... Humphrey, P. P. (1998). Blockade of human P2X7 receptor function with a monoclonal antibody. *Blood*, 92(10), 3521–3528.

- Burnstock, G. (2007). Purine and pyrimidine receptors. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(12), 1471–1483. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-6497-0>
- Chames, P., Van Regenmortel, M., Weiss, E., & Baty, D. (2009). Therapeutic antibodies: Successes, limitations and hopes for the future. *British Journal of Pharmacology*, 157(2), 220–233. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00190.x>
- Chessell, I. P., Hatcher, J. P., Bountra, C., Michel, A. D., Hughes, J. P., Green, P., ... Buell, G. N. (2005). Disruption of the P2X7 purinoceptor gene abolishes chronic inflammatory and neuropathic pain. *Pain*, 114(3), 386–96. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2005.01.002>
- Coddou, C., Yan, Z., Obsil, T., Huidobro-Toro, J. P., & Stojilkovic, S. S. (2011). Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels. *Pharmacological Reviews*, 63(3), 641–683. <https://doi.org/10.1124/pr.110.003129>
- Collo, G., Neidhart, S., Kawashima, E., Kosco-Vilbois, M., North, R. A., & Buell, G. (1997). Tissue distribution of the P2X7 receptor. *Neuropharmacology*, 36(9), 1277–83. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9364482>
- Coppieters, K., Dreier, T., Silence, K., de Haard, H., Lauwereys, M., Casteels, P., ... Rottiers, P. (2006). Formatted anti-tumor necrosis factor alpha VHH proteins derived from camelids show superior potency and targeting to inflamed joints in a murine model of collagen-induced arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 54(6), 1856–66. <https://doi.org/10.1002/art.21827>
- Danquah, W. (2012). *Selection and characterization of llama-derived anti-P2X7 single domain antibodies*. Retrieved from <http://ediss.sub.uni-hamburg.de/volltexte/2013/6359/>
- Danquah, W., Catherine, M.-S., Rissiek, B., Pinto, C., Arnau, S.-P., Amadi, M., ... Friedrich, K.-N. (2016). Nanobodies that block gating of the P2X7 ion channel ameliorate inflammation. *Science Translational Medicine*, 8(366). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf8463>
- Danquah, W., Meyer-Schwesinger, C., Rissiek, B., Pinto, C., Serracant-Prat, A., Amadi, M., ... Koch-Nolte, F. (2016). Nanobodies that block gating of the P2X7 ion channel ameliorate inflammation. *Science Translational Medicine*, 8(366), 366ra162. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf8463>
- Deen, W., Lazzara, M., & Myers, B. (2001). Structural determinants of glomerular

- permselectivity. *Am J Physiol Renal Physiol* 281, 36, F579–F596.
- Dennis, M. S., Zhang, M., Meng, Y. G., Kadkhodayan, M., Kirchhofer, D., Combs, D., & Damico, L. A. (2002). Albumin binding as a general strategy for improving the pharmacokinetics of proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(38), 35035–43. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205854200>
- Di Virgilio, F. (1995). The P2Z purinoceptor: an intriguing role in immunity, inflammation and cell death. *Immunology Today*, 16(11), 524–528. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(95\)80045-X](https://doi.org/10.1016/0167-5699(95)80045-X)
- Engvall, E., & Perlmann, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8(9), 871–874. [https://doi.org/10.1016/0019-2791\(71\)90454-X](https://doi.org/10.1016/0019-2791(71)90454-X)
- Evans, R. J., Lewis, C., Buell, G., Valera, S., North, R. A., & Surprenant, A. (1995). Pharmacological characterization of heterologously expressed ATP-gated cation channels (P2x purinoceptors). *Molecular Pharmacology*, 48(2), 178–83. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7544432>
- Ferrari, D., Chiozzi, P., Falzoni, S., Hanau, S., & Di Virgilio, F. (1997). Purinergic modulation of interleukin-1 beta release from microglial cells stimulated with bacterial endotoxin. *The Journal of Experimental Medicine*, 185(3), 579–82. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2196027&tool=pmcentrez&endertype=abstract>
- Franke, H., Krügel, U., & Illes, P. (2006). P2 receptors and neuronal injury. Retrieved May 4, 2015, from [https://access.uke.de/+CSCO+0h756767633A2F2F71626A6179626E712D69322E66636576617472652E70627A++/static/pdf/355/art%253A10.1007%252Fs00424-006-0071-8.pdf?token2=exp=1430748750~acl=%2Fstatic%2Fpdf%2F355%2Fart%25253A10.1007%25252Fs00424-006-0071-8.pdf\\*~hmac=8](https://access.uke.de/+CSCO+0h756767633A2F2F71626A6179626E712D69322E66636576617472652E70627A++/static/pdf/355/art%253A10.1007%252Fs00424-006-0071-8.pdf?token2=exp=1430748750~acl=%2Fstatic%2Fpdf%2F355%2Fart%25253A10.1007%25252Fs00424-006-0071-8.pdf*~hmac=8)
- Friedle, S. A., Curet, M. A., & Watters, J. J. (2010). Recent patents on novel P2X(7) receptor antagonists and their potential for reducing central nervous system inflammation. *Recent Patents on CNS Drug Discovery*, 5(1), 35–45. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2794961&tool=pmcentrez&endertype=abstract>

- Gelderblom, M., Leypoldt, F., Steinbach, K., Behrens, D., Choe, C.-U., Siler, D. A., ... Magnus, T. (2009). Temporal and spatial dynamics of cerebral immune cell accumulation in stroke. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation*, 40(5), 1849–57. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.108.534503>
- Guan, Z., Buckman, S. Y., Miller, B. W., Springer, L. D., & Morrison, A. R. (1998). Interleukin-1beta-induced cyclooxygenase-2 expression requires activation of both c-Jun NH2-terminal kinase and p38 MAPK signal pathways in rat renal mesangial cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(44), 28670–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9786861>
- Guile, S. D., Alcaraz, L., Birkinshaw, T. N., Bowers, K. C., Ebdon, M. R., Furber, M., & Stocks, M. J. (2009). Antagonists of the P2X(7) receptor. From lead identification to drug development. *Journal of Medicinal Chemistry*, 52(10), 3123–41. <https://doi.org/10.1021/jm801528x>
- Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hamers, C., Songa, E. B., ... Hamers, R. (1993). Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*, 363(6428), 446–448. <https://doi.org/10.1038/363446a0>
- Hansel, T. T., Kropshofer, H., Singer, T., Mitchell, J. A., & George, A. J. T. (2010). The safety and side effects of monoclonal antibodies. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(4), 325–338. <https://doi.org/10.1038/nrd3003>
- Harding, F. A., Stickler, M. M., Razo, J., & DuBridg, R. B. The immunogenicity of humanized and fully human antibodies: residual immunogenicity resides in the CDR regions. *mAbs*, 2(3), 256–65. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2881252&tool=pmcentrez&endertype=abstract>
- Holliger, P., & Hudson, P. J. (2005). Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nature Biotechnology*, 23(9), 1126–1136. <https://doi.org/10.1038/nbt1142>
- Hubert, S., Rissiek, B., Klages, K., Huehn, J., Sparwasser, T., Haag, F., ... Adriouch, S. (2010). Extracellular NAD<sup>+</sup> shapes the Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cell compartment through the ART2–P2X7 pathway. *The Journal of Experimental Medicine*, 207(12), 2561–2568. <https://doi.org/10.1084/jem.20091154>

- Humphreys, B. D., & Dubyak, G. R. (1998). Modulation of P2X<sub>7</sub> nucleotide receptor expression by pro- and anti-inflammatory stimuli in THP-1 monocytes is of interest because activation of this receptor results in the release of the pro-inflammatory cytokine interleukin-1. *THP-1 monocytic cell line*. *Induction was*, *64*(August), 265–273.
- Iadecola, C., & Anrather, J. (2011). The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nature Medicine*, *17*(7), 796–808. <https://doi.org/10.1038/nm.2399>
- Jähnichen, S., Blanchetot, C., Maussang, D., Gonzalez-Pajuelo, M., Chow, K. Y., Bosch, L., ... Smit, M. J. (2010). CXCR4 nanobodies (VHH-based single variable domains) potently inhibit chemotaxis and HIV-1 replication and mobilize stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(47), 20565–70. <https://doi.org/10.1073/pnas.1012865107>
- Köhler, G., Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, *256*(5517), 495–497.
- Labasi, J. M., Petrushova, N., Donovan, C., McCurdy, S., Lira, P., Payette, M. M., ... Gabel, C. A. (2002). Absence of the P2X<sub>7</sub> receptor alters leukocyte function and attenuates an inflammatory response. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *168*(12), 6436–45. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12055263>
- Lämmer, A., Günther, A., Beck, A., Krügel, U., Kittner, H., Schneider, D., ... Franke, H. (2006). Neuroprotective effects of the P2 receptor antagonist PPADS on focal cerebral ischaemia-induced injury in rats. *The European Journal of Neuroscience*, *23*(10), 2824–8. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04825.x>
- Lazarowski, E. R., Boucher, R. C., & Harden, T. K. (2000). Constitutive release of ATP and evidence for major contribution of ecto-nucleotide pyrophosphatase and nucleoside diphosphokinase to extracellular nucleotide concentrations. *The Journal of Biological Chemistry*, *275*(40), 31061–8. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003255200>
- Lister, M. F., Sharkey, J., Sawatzky, D. A., Hodgkiss, J. P., Davidson, D. J., Rossi, A. G., & Finlayson, K. (2007). The role of the purinergic P2X<sub>7</sub> receptor in inflammation. *Journal of Inflammation (London, England)*, *4*(1), 5. <https://doi.org/10.1186/1476-9255-4-5>
- Maloney, D. G., Liles, T. M., Czerwinski, D. K., Waldichuk, C., Rosenberg, J., Grillo-Lopez, a., & Levy, R. (1994). Phase I clinical trial using escalating single-dose infusion of

- chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (IDEC-C2B8) in patients with recurrent B-cell lymphoma. *Blood*, 84(8), 2457–2466.
- Milstein, C., & Alerts, E. (2005). Pillars Article : Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Journal of Immunology*, 174(2453–2455).
- Moon, H., Na, H. Y., Chong, K. H., & Kim, T. J. (2006). P2X7 receptor-dependent ATP-induced shedding of CD27 in mouse lymphocytes. *Immunology Letters*, 102(1), 98–105. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2005.08.004>
- Murgia, M., Hanau, S., Pizzo, P., Rippa, M., & Di Virgilio, F. (1993). Oxidized ATP. An irreversible inhibitor of the macrophage purinergic P2Z receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(11), 8199–203. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8463330>
- Murphy, K., Travers, P., Walport, M. (2009). Janeway Immunologie | Springer. In *Spektrum Akademischer Verlag* (7.Auflage, pp. 53–139). Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag. Retrieved from <http://www.springer.com/de/book/9783662442272>
- Muyldermans, S. (2001). Single domain camel antibodies: current status. *Journal of Biotechnology*, 74(4), 277–302. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11526908>
- Muyldermans, S. (2013). Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies. *Annual Review of Biochemistry*, 82(1), 775–797. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-063011-092449>
- Narcisse, L., Scemes, E., Zhao, Y., Lee, S. C., & Brosnan, C. F. (2005). The cytokine IL-1beta transiently enhances P2X7 receptor expression and function in human astrocytes. *Glia*, 49(2), 245–58. <https://doi.org/10.1002/glia.20110>
- Nieber, K., Eschke, D., & Brand, A. (1999). Brain hypoxia: effects of ATP and adenosine. *Progress in Brain Research*, 120, 287–97. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10551005>
- North, R. A. (2002). Molecular physiology of P2X receptors. *Physiological Reviews*, 82(4), 1013–67. <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2002>
- Qiu, F., & Dahl, G. (2009). A permeant regulating its permeation pore: inhibition of pannexin 1 channels by ATP. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 296(2), C250–C255. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00433.2008>

- Rashidian, M., Keliher, E. J., Bilate, A. M., Duarte, J. N., Wojtkiewicz, G. R., Jacobsen, J. T., ... Ploegh, H. L. (2015). Noninvasive imaging of immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(19), 6146–51.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1502609112>
- Rassow, J., Hauser, K., Netzker, R., & Deutzmann, R. (2008). Biochemie. In *Duale Reihe Biochemie* (2. Auflage, pp. 692–734). Thieme Verlagsgruppe, Stuttgart, New York, Delhi, Rio. Retrieved from <https://www.thieme-connect.de/products/ebooks/book/10.1055/b-002-85529>
- Rissiek, B., Danquah, W., Haag, F., & Koch-Nolte, F. (2014). Technical Advance: A new cell preparation strategy that greatly improves the yield of vital and functional Tregs and NKT cells. *Journal of Leukocyte Biology*, *95*(3), 543–549.  
<https://doi.org/10.1189/jlb.0713407>
- Rissiek, B., Koch-Nolte, F., & Magnus, T. (2014). Nanobodies as modulators of inflammation: potential applications for acute brain injury. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *8*, 344. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00344>
- Schirrmann, T., & Büssow, K. (2010). Transient Production of scFv-Fc Fusion Proteins in Mammalian Cells. In R. Kontermann & S. Dübel (Eds.), *Antibody Engineering* (pp. 387–398). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-01147-4\\_30](https://doi.org/10.1007/978-3-642-01147-4_30)
- Sim, J. A., Young, M. T., Sung, H.-Y., North, R. A., & Surprenant, A. (2004). Reanalysis of P2X7 receptor expression in rodent brain. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *24*(28), 6307–14.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1469-04.2004>
- Skaper, S. D., Debetto, P., & Giusti, P. (2010). The P2X7 purinergic receptor: from physiology to neurological disorders. *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *24*(2), 337–345.  
<https://doi.org/10.1096/fj.09-138883>
- Sun, C., Heid, M. E., Keyel, P. A., & Salter, R. D. (2013). The second transmembrane domain of P2X7 contributes to dilated pore formation. *PLoS One*, *8*(4), e61886.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061886>

- Surprenant, A., & North, R. A. (2009). Signaling at purinergic P2X receptors. *Annual Review of Physiology*, 71, 333–359. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.70.113006.100630>
- Tijink, B. M., Laeremans, T., Budde, M., Stigter-van Walsum, M., Dreier, T., de Haard, H. J., ... van Dongen, G. a M. S. (2008). Improved tumor targeting of anti-epidermal growth factor receptor Nanobodies through albumin binding: taking advantage of modular Nanobody technology. *Molecular Cancer Therapeutics*, 7(8), 2288–2297. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-07-2384>
- Vaneycken, I., D&apos;huyvetter, M., Hernot, S., de Vos, J., Xavier, C., Devoogdt, N., ... Lahoutte, T. (2011). Immuno-imaging using nanobodies. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(6), 877–881. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.06.009>
- Vitiello, L., Gorini, S., Rosano, G., & La Sala, A. (2012). Immunoregulation through extracellular nucleotides. *Blood*, 120(3), 511–518. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-01-406496>
- Warrell, M. J. (2012). Intradermal Rabies Vaccination: The Evolution and Future of Pre- and Post-exposure Prophylaxis. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 351, 139–157. <https://doi.org/10.1007/82>
- Weber, F. C., Esser, P. R., Müller, T., Ganesan, J., Pellegatti, P., Simon, M. M., ... Martin, S. F. (2010). Lack of the purinergic receptor P2X(7) results in resistance to contact hypersensitivity. *The Journal of Experimental Medicine*, 207(12), 2609–19. <https://doi.org/10.1084/jem.20092489>
- Wesolowski, J., Alzogaray, V., Reyelt, J., Unger, M., Juarez, K., Urrutia, M., ... Koch-Nolte, F. (2009). Single domain antibodies: Promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Medical Microbiology and Immunology*, 198(3), 157–174. <https://doi.org/10.1007/s00430-009-0116-7>
- Zhang, J., Liu, X., Bell, A., To, R., Baral, T. N., Azizi, A., ... Durocher, Y. (2009). Transient expression and purification of chimeric heavy chain antibodies. *Protein Expression and Purification*, 65(1), 77–82. <https://doi.org/10.1016/J.PEP.2008.10.011>

## **Patent**

Danquah W, Nolte F, Laermans T, Stortelers C. 2013. P2X7 receptor antagonists and agonists. Patent WO2013178783

## **Danksagung**

An erster Stelle gilt mein Dank meinem Doktorvater Herr Prof. Dr. med. Tim Magnus, der mir die Möglichkeit zur Erarbeitung meiner Dissertation gegeben hat. Dem nächsten, dem ich danken möchte ist Herr Prof. Dr. med. Friedrich Koch-Nolte, der immer mit einem guten Rat zur Seite stand und die Nanobodies zur Verfügung gestellt hat, ohne die die Arbeit nicht existieren würde. Des Weiteren Danke ich Joanna Schmid, Marion Nissen und Ellen Orthey für ihr technisches Geschick und die viele Hilfe bei den alltäglichen Laborarbeiten. Ein Besonderer Dank geht an meinen Betreuer Herr Dr. rer. nat. Björn Rissiek für seine wissenschaftliche und methodische Anleitung während der gesamten Bearbeitungsphase meiner Dissertation, für die zahlreichen und unermüdlichen fachliche Gespräche, Ratschläge und Anmerkungen und für seine Geduld, besonders bei den mathematischen und von Informatik geprägten Herausforderungen dieser Arbeit. Auch die vielen nicht-fachlichen und motivierenden Gespräche haben meine Arbeit unterstützt.

Außerdem möchte ich William Fumey, Carolina Pinto Espinoza und Priya Arunachalam für die Auflockerung der Arbeit, ihre Hilfe und ihre Freundschaft danken.

Besonders möchte ich an dieser Stelle meiner Familie danken, die mich auf meinem Lebensweg und nicht zuletzt auch durch das Studium stets unterstützt und motiviert hat.

## **Lebenslauf**

Aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....