

4. Diskussion

Diese Arbeit verfolgte das Ziel, ein Expressionssystem aufzubauen, durch das sich rekombinante Fusionsantikörper für die zu etablierende Anwendung einer antikörpergesteuerten Enzym-Prodrug-Therapie in funktionaler Form herstellen lassen.

Dieses Ziel konnte durch das hier etablierte Expressionssystem in dem Hefestamm *Pichia pastoris* erreicht werden. Zugleich spiegeln die Ergebnisse dieser Arbeit ein grundsätzliches Problem bei der Herstellung von Proteinen in Mikroorganismen wieder: nicht jedes Protein ist in jedem Zielorganismus exprimierbar, so dass häufig die DNA-Sequenz eines Proteins an die exprimierende Spezies angepasst werden muss (66).

So wurde einerseits der A33rbGFP Fusionsantikörper durch ein bakterielles Expressionssystem zunächst in Form unlöslicher und damit funktionsloser Einschlusskörper exprimiert. Das eukaryontische *Pichia pastoris* Expressionssystem war dagegen in der Lage, die DNA-Sequenz richtig umzusetzen, so dass der A33rbGFP Fusionsantikörper als lösliches und bifunktionelles Molekül sezerniert wurde: das Single-Chain-Fragment band an das A33-Zielantigen, und zugleich strahlte das Green-Fluorescent-Protein (GFP) nach Anregung mit UV-Licht das erwartete Lichtspektrum ab.

Andererseits war das in Bakterien exprimierbare A33rbCD Fusionskonstrukt desselben Einzelketten-Antikörpers und einer bakteriellen Cytosindeaminase bei gleichem Vorgehen nicht in der Hefe *Pichia pastoris* herstellbar. Um dieses Hindernis zu überwinden, wurde die DNA-Sequenz für das Fusionsprotein A33rbCDy generiert, bei dem die Cytosindeaminase nicht mehr bakterieller Herkunft war, sondern aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* stammt.

Bei der Kultivierung und Expression verband die Hefe *Pichia pastoris* einen komplexen eukaryontischen Syntheseapparat mit den Vorteilen eines bakteriellen Expressionssystems, da sich die Hefen ähnlich wie Bakterien unter einfachen Kulturbedingungen schnell expandieren ließen, so dass die Menge des produzierten A33rbGFP Fusionsproteins im Prinzip beliebig zu vermehren war.

4.1. Etablierung eines Expressionssystems zur Herstellung eines funktionellen

A33rbGFP Fusionsantikörpers in *Pichia pastoris*

Durch die methodische Etablierung eines Hefeexpressionssystems mit dem Stamm *Pichia pastoris* für den Fusionsantikörper A33rbGFP sollte gezeigt werden, dass Hefen grundsätzlich ein geeignetes Expressionssystem zur Herstellung bifunktionaler Fusionsantikörper sind.

4.1.1. Transformation und Selektion von *Pichia pastoris* Klonen

Zunächst mussten durch Transformation und Selektion Hefeklonen generiert werden, die in ihr Genom das A33rbGFP Fusionsgen integriert hatten.

Die Ergebnisse der Transformation und Selektion stammen aus mehreren Ansätzen, wobei die Transformation mit den Vektorkonstrukten pPIC 9-A33rbGFP und pPIC 9 K-A33rbGFP für die beiden *Pichia pastoris* Stämme GS115 und KM71 grundsätzlich der gleichen Methodik folgte.

Dabei ist die Beobachtung interessant, dass bei der zunächst eingesetzten Histidin-Selektion mit dem Vektor-Grundgerüst pPIC 9 im Gegensatz zur theoretischen Erwartung nicht alle wachsenden Klone im Besitz des integrierten Vektorkonstrukts waren, denn nur die Klone mit erfolgter Transformation sollten eine Genausstattung haben, die ihnen ein Überleben auf Histidin-defizienten Nährböden ermöglicht. Von dieser Überlegung ausgehend zeigte aber beim Testen auf Expression keiner dieser Klone die Synthese des A33rbGFP Konstrukts. Offensichtlich bedurfte es eines stärkeren Selektionsdrucks als durch das Überleben ohne Histidinquelle aufzubauen war, da dieses Selektionskriterium von vielen Klonen durchbrochen wurde. Eine mögliche Erklärung dafür ist symbiotisches Wachstum nicht transformierter Klone in räumlicher Nähe zu Klonen mit integriertem Vektor, die Histidin synthetisierten und dieses durch Diffusion im Medium an Nachbarklone weitergeben konnten. Die nötige Intensivierung des Selektionsdrucks wurde durch den Vektor pPIC 9 K erreicht. Dieser enthält zusätzlich ein Resistenzgen für das Überleben auf Kanamycin-haltigen Nährböden. Dadurch konnten die Klone nach ihrer Transformation zunächst auf Histidin-defizienten Nährböden kultiviert werden. Danach folgte die sequentielle Übertragung der hier wachsenden Klone auf Nährböden mit Kanamycin in zunehmender Konzentration.

Hierzu wurden die Klone entweder mittels eines Stempelkissens oder nach Abwaschen mit 300 µl sterilem Wasser als Hefezellsuspension auf die Kanamycin-haltigen Nährböden übertragen. Diese vergleichende Versuchsanordnung legte ebenfalls nahe, dass die symbiotische Resistenzübertragung eine wichtige Rolle bei der Durchbrechung des Selektionsdrucks darstellte, denn der Übertrag durch Abwaschen der Platten ergab auf den Kanamycin-haltigen Nährböden in allen Konzentrationen rasenartiges Wachstum, während beim Übertrag durch das Stempelkissen die Klone nur vereinzelt wuchsen.

Dieses ist zu erklären aus der Dichte der übertragenen Klone. Durch das Stempelkissen ist anzunehmen, dass die Klone weiter vereinzelt wurden, so dass Querernährung oder –schutz nicht möglich waren. Beim Übertrag durch die Abwaschprozedur wurden alle Klone ohne räumliche Vereinzelnung übertragen. Das symbiotische Leben von Klonen mit und ohne Vektorintegration war hiermit weiterhin möglich, da nicht selektiv nur auf Histidin-defizienten Nährböden wachsende Klone dem weiteren Selektionsprozess zugeführt wurden.

Durch den Übertrag mit dem Stempelkissen auf Kanamycin-haltige Nährböden konnte das Ziel einer weiteren Selektion erreicht werden, denn mit aufsteigender Kanamycin-Konzentration nahm die Anzahl der wachsenden Klone ab.

Dieses Ergebnis deutet zugleich darauf hin, dass sogenannte multi-copy-Insertionsklone generiert wurden, die mehrere Kopien des Resistenzgens – und damit mutmaßlich auch des zu exprimierenden DNA-Abschnitts – integriert hatten. Dabei wird davon ausgegangen, dass die Kanamycin-Resistenz quantitativ mit der Zahl der Kopien des Resistenzgens zunimmt. Da das Resistenzgen mit dem DNA-Abschnitt für die Fusionsantikörper über das Vektorrückgrat pPIC 9 K gekoppelt war, konnte weiterhin davon ausgegangen werden, dass auch der DNA-Abschnitt für das Fusionsprotein mehrfach in das Hefegenom integriert war, was eine quantitativ gesteigerte Expression des gesuchten Fusionsproteins erwarten ließ (70).

Aus dieser Überlegung wurden alle weiteren Arbeitsschritte mit Klonen vorgenommen, die auch noch auf der höchsten Kanamycinkonzentration (4mg/ml) wuchsen.

4.1.2. PCR-Analyse zur Überprüfung der genomischen Integration

Auch Expressionsansätze der Kanamycin-resistentesten Klone zeigten zunächst keine Expression des A33rbGFP Fusionsantikörpers. Deshalb musste eine Methode etabliert werden, um den DNA-Abschnitt des A33rbGFP Fusionsantikörpers in den Hefeklonen direkt

nachzuweisen. Auf diese Weise sollte untersucht werden, ob die ausbleibende Expression in der fehlenden Integration des Vektorkonstrukts begründet war.

Durch eine PCR mit dem Primerpaar 5'AOX / 3'AOX wurde versucht, die genomische Integration nachzuweisen. Durch dieses Primerpaar entstand aufgrund des Wildtyp-AOX-Gens von *Pichia pastoris* ein Amplifikat von ca. 2.2 kbp in nicht-transformierten Klonen. Bei integriertem A33rbGFP Konstrukt war statt dessen ein Amplifikat von 2.0 kbp zu erwarten. Da dieser vergleichsweise gering Unterschied jedoch chromatografisch nicht ausreichend sicher nachzuweisen war, wurde zusätzlich ein weiteres Primerpaar verwendet, das nur an den flankierenden Sequenzen des A33rbGFP DNA-Abschnitt band. Hierzu wurde das Primerpaar 5'A33rbGFPdiagnostic / 3'A33rbGFPdiagnostic entworfen, das ein ca. 1,5 kbp großes DNA-Amplifikat definierte.

Mit dieser Methode wurden Klone gefunden, aus deren Genom Amplifikate mit beiden Primerpaaren zu generieren waren. Damit war ein spezifischer Nachweis des integrierten A33rbGFP DNA-Abschnitts möglich. Es wurden im Folgenden nur Klone verwendet, bei denen dieser Nachweis der Integration positiv war, um als mögliche Ursache der bis hierhin ausbleibenden Expression des A33rbGFP Fusionsantikörpers eine nicht vorhandene Integration des Fusionsgenoms auszuschließen.

4.1.3. Expression des Fusionsproteins A33rbGFP

Der A33rbGFP Fusionsantikörper konnte im Western Blot durch einen primären, murinen anti-GFP-IgG-Antikörper und einen sekundären Peroxidase-gekoppelten anti-Maus-IgG-Antikörper nachgewiesen werden (Abb. 3.15.). Nach den zuvor beschriebenen Schritten der Selektion und PCR-Analyse wurden auf diese Weise fünf Klone identifiziert, die den Fusionsantikörper A33rbGFP in das Kulturmedium exprimierten. Dieses Ergebnis erlaubt die grundsätzliche Aussage, dass der Fusionsantikörper A33rbGFP durch *Pichia pastoris* in löslicher Form exprimiert werden kann.

4.1.4. Funktionsanalyse des Fusionsproteins A33rbGFP

Mehrere funktionelle Assays wurden etabliert, um die Bifunktionalität des A33rbGFP Fusionsantikörpers aus dem unbehandelten Kulturüberstand zu überprüfen, da die direkte

Expression des funktionalen Proteins in den Überstand der angestrebte entscheidende Vorteil gegenüber einem bakteriellen Expressionssystem war.

Diese Assays verfolgten das Ziel, das Bindungsverhalten des A33-Single-Chain-Fragments und die Funktion des mit ihm fusionierten Green-Fluorescent-Proteins (GFP) nachzuweisen. Die Fluoreszenz des Green-Fluorescent-Proteins (GFP) selbst ermöglicht dieses auf einfache Weise, da sie semiquantitativ vergleichend im Fluoreszenzmikroskop und quantitativ mittels Fluoreszenzdurchflusszytometer (FACS) zu beurteilen war. Da die Fluoreszenzaktivität des Green-Fluorescent-Protein mit dem A33-Single-Chain-Fragment fest gekoppelt war, enthielten die Fluoreszenzmessungen zugleich Aussagen zum Bindungsverhalten des Antikörpers.

4.1.4.1. Semiquantitative Funktionsanalyse des Fusionsproteins A33rbGFP

Die Fluoreszenzmikroskopie erlaubt die direkte Beobachtung und semiquantitative Beurteilung von Fluoreszenzunterschieden durch den gebundenen A33rbGFP Fusionsantikörper und liefert damit erste Aussagen zu dessen Funktionalität.

Die A33-Antigen-positive Zelllinie LIM 1215 (75) eignete sich für die Verwendung im Fluoreszenzmikroskop, denn die Zellen zeigten im nativen Ausstrich kaum Eigenfluoreszenz. Da es sich bei der Beurteilung um ein subjektiv vergleichendes Verfahren handelt, können nur deutliche Fluoreszenzunterschiede zur Beurteilung der Antikörperbindung verwendet werden. Die geringe Eigenfluoreszenz ist deshalb von Bedeutung, um im Verhältnis zur Autofluoreszenz ein möglichst starkes Signal der wahrnehmbaren Fluoreszenzzunahme durch den gebundenen Antikörper zu erhalten.

Die Inkubation der Kolonkarzinomzellen LIM 1215 mit dem A33rbGFP-haltigen Kulturüberstand zeigte in der Fluoreszenzmikroskopie eine Fluoreszenzzunahme als Hinweis auf seine Funktionalität. Allerdings enthielt dieses Ergebnis keine Aussage über die Spezifität der Bindung (Abb. 3.31.).

Die Fluoreszenzmikroskopie bietet außerdem im Gegensatz zur Durchflusszytometrie die Möglichkeit der morphologischen Beurteilung von Gewebeschnitten. Dadurch waren das Bindungsverhalten des A33rbGFP Fusionsantikörpers und seine Lokalisation im Gewebe zu beobachten. Zu diesem Zweck wurden Mikrotomschnitte eines Kolonepithels mit dem A33rbGFP Fusionsantikörper inkubiert. Nach der Inkubation stellten sich deutlich die Zellen

des Kolonepithels durch Fluoreszenz dar, während derselbe Schnitt vor der Inkubation nur schwache unspezifische Eigenfluoreszenz zeigte (Abb. 3.38.). Eine geeignete Negativkontrolle für dieses Experiment wäre ein irrelevanter, GFP-gekoppelter Fusionsantikörper, der zum Zeitpunkt dieser Untersuchungen jedoch noch nicht zur Verfügung stand.

Zusammengefasst wiesen diese Resultate bereits auf die Bifunktionalität des hergestellten Fusionsproteins hin, da der A33rbGFP Fusionsantikörper einerseits an A33-positive Zellen band und damit andererseits eine ausreichende Fluoreszenz zur mikroskopischen Beurteilung bewirkte.

4.1.4.2. Quantitative Funktionsanalyse des Fusionsproteins A33rbGFP

Durchflusszytometrische Untersuchungen an Zellsuspensionen ermöglichen eine quantitative Analyse der Fluoreszenz anhand relativer Fluoreszenzwerte. Damit können auch geringe Fluoreszenzunterschiede gemessen werden, wodurch sich die Möglichkeit eröffnet, das Bindungsverhalten durch komplexere Assays auf seine Spezifität zu prüfen.

Dabei sind zwei Versuchstypen zu unterscheiden, die zur Klärung des spezifischen Antikörperbindungsverhaltens beitragen: der direkte Antigen-Antikörper-Bindungstest und der Inhibitionstest durch Blockierung des Antigens mit anschließendem Antikörperbindungstest.

Beim direkten Bindungstest wird die Bindung des Antikörpers an das Zielantigen im Vergleich zu Zelloberflächen nachgewiesen, die entweder nicht mit dem zu analysierenden Antikörper inkubiert wurden oder die kein Zielantigen tragen.

Beim Inhibitionstest werden das Zielantigen tragende Zellen zuerst mit einem dieses Antigen bindenden Kontrollantikörper vorinkubiert. Der überschüssige Antikörper wird entfernt. Anschließend wird mit dem zu untersuchenden Antikörper inkubiert. Ist hierbei eine Fluoreszenzabschwächung im Vergleich zu einem nicht vorinkubierten Ansatz festzustellen, dann spricht dies für ein spezifisches Binden des zu untersuchenden Antikörpers an das Zielantigen. Als Kontrollantikörper wurde hier ein kompletter IgG-Antikörper gegen das A33-Zielantigen verwendet.

Das Fluoreszenzdurchflusszytometer (FACS) ermöglicht die Beobachter-unabhängige Detektion geringer Fluoreszenzveränderungen. Diese Ergebnisse sind dadurch weniger abhängig von Randbedingungen wie zum Beispiel der Eigenfluoreszenz einer Zelllinie.

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchungen an LIM 1215 Kolonkarzinomzellen bestätigten zunächst die Beobachtungen am Fluoreszenzmikroskop: im Vergleich zu nicht inkubierten Zellen, ist eine deutliche Fluoreszenzzunahme nach Inkubation mit dem A33rbGFP Fusionsantikörper zu messen. Dabei wurde als weitere Negativkontrolle die Zelllinie HT 29 verwendet, bei der eine geringere A33-Antigenpräsentation bekannt war (49). Nach Inkubation der HT 29 Zellen mit A33rbGFP Fusionsantikörpern ist eine deutlich geringere Fluoreszenzzunahme zu messen als nach Inkubation der LIM 1215 Zellen. Dieses Ergebnis für sich legt bereits ein spezifisches Bindungsverhalten des A33rbGFP Fusionsantikörpers an das A33-Antigen nahe.

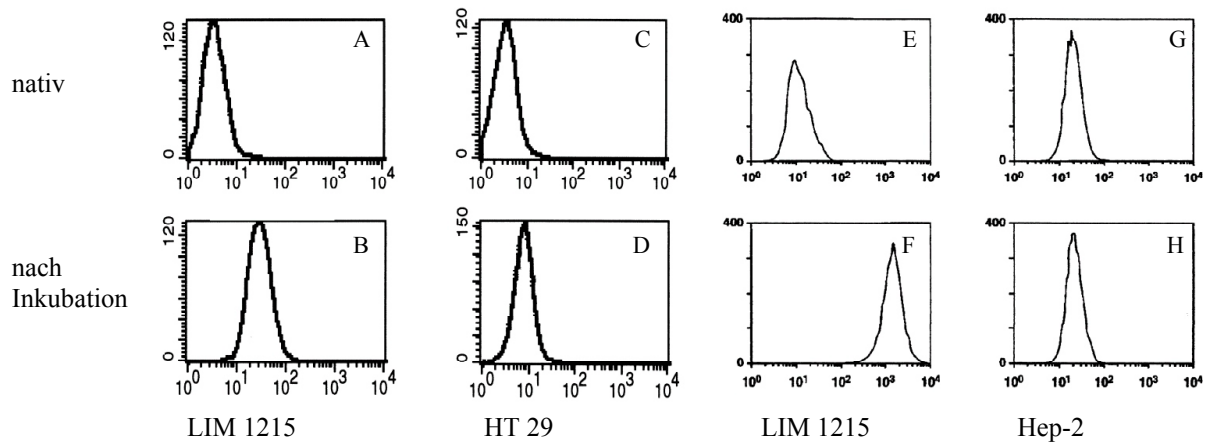


Abb. 4.1. Vergleichende Darstellung der Fluoreszenzdurchflusszytometrie von Catimel et al. (Bilder E-H) und Ergebnissen dieser Arbeit (Bilder A-D). Die A33 positive Zelllinie LIM 1215 (Bilder E und F) und die A33 negative Zelllinie Hep-2 (Bilder G und H) wurden beide mit einem murinen A33-IgG Antikörper inkubiert. Es folgte die Inkubation mit einem sekundären Fluoreszein-gekoppelten Antikörper gegen murines IgG. Eine deutliche Fluoreszenzzunahme ist bei der Zelllinie LIM 1215 im Vergleich zur Zelllinie Hep-2 nach Inkubation mit beiden Antikörpern zu beobachten. Die Zelllinien LIM 1215 (Bilder A und B) und HT 29 (Bilder C und D) wurden mit dem A33rbGFP Fusionsantikörper inkubiert. Dabei zeigt sich eine Fluoreszenzzunahme im Vergleich zur Autofluoreszenz bei der A33-positiven Zelllinie LIM 1215. Bei der Zelllinie HT 29 kommt es zu einer geringeren Fluoreszenzzunahme.

Catimel et al. zeigten mit einem ähnlichen Versuchsaufbau, dass das A33-Antigen auf der Zelloberfläche von Kolonkarzinomzelllinien exprimiert wird und dort mittels Durchflusszytometrie nachweisbar ist (77). Dazu inkubierten sie im ersten Schritt die Zelllinien LIM 1215 und Hep-2 mit einem murinen, monoklonalen IgG-A33-Antikörper. Die Zelllinie Hep-2 wurde als Negativkontrolle verwendet, da sie kein A33-Antigen präsentiert. Im zweiten Schritt wurden die vorinkubierten Zellen mit einem Fluoreszein-gekoppelten Antikörper gegen murines Immunglobulin G inkubiert.

Die durchflusszytometrischen Ergebnisse von Catimel et al. sind in Abbildung 4.1. den bereits im Ergebnisteil vorgestellten Ergebnissen dieser Arbeit gegenübergestellt. Dabei zeigt die A33-positive Zelllinie LIM 1215 im Gegensatz zur A33-negativen Zelllinie Hep-2 eine deutliche relative Fluoreszenzzunahme. Diese Ergebnisse von Catimel et al. entsprechen damit in ihrer Aussage den hier präsentierten. Die Fluoreszenzzunahme ist dort jedoch deutlich stärker, als hier mit A33rbGFP Fusionsantikörper zu beobachten war. Eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied ist zum einen, dass der IgG-A33-Antikörper mit höherer Affinität an das A33-Zielantigen bindet als der A33rbGFP Fusionsantikörper, denn der komplette IgG-Antikörper ist bivalent im Gegensatz zum monovalenten Single-Chain-Fragment. Zum anderen ist die stärkere Fluoreszenzzunahme bei Catimel et al. mit einer Signalverstärkung durch den sekundären Antikörper zu erklären, da mehrere sekundäre Antikörper an einen A33-IgG-Antikörper binden können.

Dass der A33-IgG-Antikörper das A33-Zielantigen mit höherer Affinität bindet als A33rbGFP Fusionsantikörper, konnte mit der freundlichen Unterstützung von Dr. G. Ritter und L. Cohen am Ludwig Institute of Cancer Research, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, USA, durch dort durchgeführte Biosensor-Bindungsanalysen quantitativ nachgewiesen werden. Die Analyse zeigte, dass sowohl der A33rbGFP Fusionsantikörper als auch der A33-IgG-Antikörper an das A33-Zielantigen binden, der A33-IgG Antikörper im Vergleich zum A33rbGFP Fusionsantikörper jedoch eine doppelt so hohe Affinität besaß (Abb. 3.37.).

Dass es sich um ein spezifisches Bindungsvermögen des Fusionsantikörpers A33rbGFP handelt, konnte schließlich durch Blockieren des A33-Antigens mit einem kompletten IgG-huA33 Antikörper nachgewiesen werden. Seine bekannte spezifische Bindung an das A33-Zielantigen hatte zur Folge, dass die durch Fluoreszenz nachgewiesene Bindung des A33rbGFP Fusionsantikörpers an die Zelllinie LIM 1215 um den Faktor 4 niedriger war als

ohne Vorinkubation mit dem A33-IgG Antikörper. Die Vorinkubation mit einem irrelevanten IgG-Antikörper gleichen Isotyps hatte keinen Effekt auf das Fluoreszenzverhalten.

Zusammengefasst belegen diese Resultate das spezifische Bindungsvermögen des Fusionsantikörpers an das A33-Zielantigen.

4.2. Versuch der Etablierung eines Hefeexpressionssystems für den A33rbCD

Fusionsantikörper

Im Folgenden sollte gezeigt werden, dass auch ein Effektorfusionsantikörper für die antikörpergesteuerte Enzym-Prodrug-Therapie mit dem für den A33rbGFP Fusionsantikörper etablierten Hefeexpressionssystem hergestellt werden kann.

4.2.1. Nachweis des A33rbCD Fusionsantikörpers

Durch den Wechsel vom Vektorrückgrat pET 25 auf pPIC 9 K stand der zuvor für die Detektierung des Proteins verwendete 6xHistidin-Anhang des pET 25 nicht mehr zur Verfügung. Daher musste ein neues Western-Blot-Verfahren etabliert werden, um den A33rbCD-Fusionsantikörper nachzuweisen.

Hierfür wurde das Zellysate eines induzierten *Escherichia coli* Klon als Positivkontrolle verwendet. Als primäres Nachweisreagenz wurde Protein L, als sekundäres Peroxidase-gekoppeltes Streptavidin eingesetzt. Durch Vorarbeiten von Deckert et al. war gezeigt worden, dass der verwendete bakterielle Klon den A33rbCD Fusionsantikörper produzierte (49).

Protein L ist ein Immunglobulin-bindendes Protein, das ursprünglich aus dem Bakterium *Peptostreptococcus magnus* stammt. Es bindet als Ligand an der leichten Kette der Immunglobuline und eröffnet damit die Möglichkeit, verschiedene Klassen und Subklassen von Immunglobulinen nachzuweisen, indem als sekundärer Ligand an biotinyliertes Protein L Peroxidase-gekoppeltes Streptavidin binden kann. Des Weiteren bindet Protein L auch an kleine antigenbindende Antikörperfragmente wie Fab- oder Single-Chain-Fragmente (78).

Der Western Blot der Abb. 3.4. zeigt, dass es sich hierbei im Vergleich zum anti-GFP-Western-Blot um ein relativ unspezifisches Nachweisverfahren handelt. Dies wird durch die

Ergebnisse des Versuchs 3.10. deutlicher, bei dem ohne Erfolg versucht wurde, die Spezifität des Nachweises des Single-Chain-Fragments mit verschiedenen Mengen an eingesetztem Streptavidin oder Protein L zu steigern, da das Streptavidin direkt an Teile des Hefezelllysats band.

Protein L ist dennoch in der Lage, als primäres Nachweisreagenz an das Single-Chain-Fragment zu binden, wie die Ergebnisse mit den Zelllysaten der Bakterienkulturen zeigten: hier ist eine deutlich verstärkte Bande im Blot zu erkennen, die mit ihrer Proteingröße von ca. 70 kDa dem A33rbCD Fusionsantikörper entspricht.

Das Nachweissystem findet seine Grenzen bei der Analyse der Hefezelllysate aufgrund der unspezifischen Bindung des Streptavidins. Dadurch ist mit diesem Nachweisverfahren die Suche nach intrazellulärer Expression erschwert. Durch das Mitführen einer Negativkontrolle, die aus dem Zelllysate eines nicht transfizierten Hefeklons besteht, war dieses Problem wenigstens teilweise zu umgehen, wenn dies auch eine geringere Sensitivität zur Folge hatte, so dass bei geringer Proteinexpression produzierende Klone falsch negativ beurteilt werden konnten.

Dem steht der Vorteil gegenüber, dass der nun fehlende 6xHistidin-Anhang des pET 25 Vektors sich nicht hinderlich auf die Expression und funktionelle Konfiguration des Fusionsantikörpers auswirken kann. Ein solcher negativer Einfluss des 6xHistidin-Anhangs auf die Sekundär- und Tertiärstruktur des Fusionsantikörpers kann aufgrund von Ladungsverschiebungen und Wasserstoffbrückenbindungen angenommen werden (79).

4.2.2. Expressionsversuch des A33rbCD Fusionsantikörpers

Im Gegensatz zur Expression des A33rbGFP Fusionsantikörpers war in verschiedenen Ansätzen bei methodisch analogem Vorgehen und ähnlicher Zahl selektionierter und auf Genintegration untersuchter Klone eine Expression des A33rbCD-Fusionsantikörpers weder mit dem Vektor pPIC 9 noch mit pPIC 9 K zu erreichen. Die Ursachen für dieses negative Ergebnis ließen sich im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend klären. Es können jedoch verschiedene Hypothesen aufgestellt werden, um das weitere Vorgehen für dieses Forschungsprojekt zu planen.

Da sich der A33rbGFP Fusionsantikörper nach Etablierung des Expressionssystems sehr stabil, reproduzierbar und mit hoher Ausbeute herstellen ließ, liegt es nahe, die Unterschiede

zwischen beiden Konstrukten zu untersuchen. Dabei beschränkt sich dieser allein auf die Effektor Komponente Cytosindeaminase, die gegen das Green-Fluorescent-Protein ausgetauscht wurde. Die übrigen Teile des Vektorkonstrukts glichen sich exakt in ihren Sequenzen für das Single-Chain-Fragment, den Linker sowie die vorangestellten Start- und Signalsequenzen.

Die DNA-Sequenzen des A33rbCD- und des A33rbGFP-Fusionskonstrukts unterscheiden sich in ihrer zu erwartenden Größe um ca. 20 kDa. Deshalb kann vermutet werden, dass die Molekulargröße negativen Einfluss auf die Expression nimmt. Grundsätzlich schließt diese Größe eine Expression jedoch nicht aus, denn es sind bereits von anderen Arbeitsgruppen Proteine mit ähnlicher Größe (ca. 70 kDa) in *Pichia pastoris* exprimiert worden (80).

Sowohl das Green-Fluorescent-Protein als auch die Cytosindeaminase sind bakterieller Herkunft, so dass ein grundsätzliches Expressionshindernis aus der unterschiedlichen Klassenzugehörigkeit von Bakterien versus Hefen nicht erwartet werden muss. Dennoch ist eine wesentliche Rolle des Speziesunterschiedes nicht auszuschließen, da die Cytosindeaminase aus *Escherichia coli*, das Green-Fluorescent-Protein dagegen ursprünglich aus einer *Aequorea* Spezies stammt (81) und seither in einer Vielzahl verschiedener pro- und eukaryontischer Expressionssysteme eingesetzt worden ist.

Schließlich erzwang das A33rbCD Konstrukt einen Wechsel der Restriktionsschnittstelle zur Linearisierung des Vektors vor der Transformation, da sich die Schnittstellen für das Restriktionsenzym *Pme* I innerhalb des A33rbCD Konstrukts befanden. Dadurch konnte nicht mehr wie beim A33rbGFP-Konstrukt diese Schnittstelle genutzt werden. Zur Linearisierung musste nun die Schnittstelle des Restriktionsenzym *Sal* I genutzt werden. Dies führte zur Integration an einem anderen Genlocus im Hefegenom als bei der Transformation mit A33rbGFP Fusionskonstrukt.

Alle diese genannten Unterschiede können auf verschiedene Weise zu Problemen der Exprimierbarkeit führen. So kann im ersten Schritt der Proteinexpression bei der Transkription eine mRNA entstehen, die aufgrund ihrer Struktur die weitere Prozessierung negativ beeinflusst. Dabei spielt die Stabilität der mRNA eine wichtige Rolle, da diese nicht nur von ihren flankierenden Sequenzen des rekombinanten Genabschnitts abhängt, sondern auch direkt von dem zu exprimierenden DNA-Abschnitt (82). Außerdem können Sequenzabschnitte der mRNA die Initiation der Translation behindern (82).

Darüber hinaus kann die für den Hefeorganismus untypische mRNA einen negativen Einfluss auf die Translation haben. Durch die Degeneration des genetischen Codes besteht die Möglichkeit, dass die Proteinbiosynthese des Hefeorganismus bevorzugt andere Tripletts zur Kodierung von Aminosäuren verwendet als die des bakteriellen. Das könnte in der Hefe einen Mangel an bestimmten tRNAs entstehen lassen, wodurch die Fortsetzung der entstehenden Aminosäurenkette abgebrochen werden könnte (83).

In diesem Fall wäre trotzdem die Herstellung von – allerdings unterschiedlich langen – Fragmenten der Single-Chain-Komponente zu erwarten gewesen. Da sich aber der Nachweis mittels Protein L als relativ unspezifisch herausgestellt hatte, war die eindeutige Zuordnung einer Bande von ca. 25 kDa (entspricht dem Molekulargewicht des A33-Single-Chain-Fragments) schwierig, so dass die Beantwortung dieser Frage nicht abschließend mit dieser Nachweismethode erreichbar schien.

Die Detektion kann ebenfalls durch die Bildung von Oligomeren des erfolgreich exprimierten Zielproteins erschwert sein (84), wodurch das zu suchende Molekulargewicht zugenommen hätte. Da der verwendete Probenpuffer zum Beladen der Protein-Gele reduzierende und denaturierende Eigenschaften hatte, wäre zu erwarten gewesen, dass diese Oligomere dennoch wie Monomere detektierbar gewesen wären, sofern sie in den Kulturüberstand sezerniert worden wären.

Da hier auf die Sekretion des hergestellten Proteins in das Medium abgezielt wurde, besteht schließlich die Möglichkeit, dass der A33rbCD Fusionsantikörper intrazellulär exprimiert aber nicht sezerniert wurde. Diese Möglichkeit lässt sich ebenfalls aufgrund des unspezifischen Nachweisverfahrens mit Protein L nicht beurteilen, da eine starke Kreuzreaktivität des aus vielen Proteinen von unterschiedlichstem Molekulargewicht bestehenden *Pichia-pastoris*-Zelllysats mit Streptavidin vorlag.

Zur Überwindung dieser Probleme könnten drei Ansätze beitragen. Zum einen ist entscheidend, ein Nachweissystem zur Verfügung zu haben, das zugleich spezifisch und sensitiv den A33rbCD Fusionsantikörper detektieren kann. Dies ist zu realisieren, indem an den A33rbCD DNA-Abschnitt ein 6xHistidin-Anhang kloniert wird, der dann mit einem anti-Histidin-Antikörper als primärem Nachweisreagenz im Western Blot spezifisch nachweisbar wäre. Dieser Schritt beinhaltet den bereits diskutierten Nachteil, dass die 6-fache Histidinsequenz die Sekundär- oder Tertiärstruktur des Fusionsantikörpers und damit seine Funktionalität beeinträchtigen könnte. Darüber hinaus werden für spätere mögliche klinische

Studien reine Proteine ohne derartige Anhänge (als „Tag-Sequenzen“ bezeichnet) verlangt, so dass das Einführen einer solchen Sequenz nicht erstrebenswert ist. Das Nachweisproblem könnte auch über einen spezifischen Antikörper gegen die Cytosindeaminase gelöst werden, der zum jetzigen Zeitpunkt jedoch nicht kommerziell verfügbar ist.

In diesem Zusammenhang ist auch zu erwähnen, dass die Suche nach Klonen mit Integration des Vektorkonstrukts durch einen hohen methodischen und zeitlichen Aufwand gekennzeichnet ist. Aus diesem Grund war die Zahl der Klone, die die gesamte Selektion und Expressionstestung durchlaufen haben, im zeitlichen und personellen Rahmen dieser Arbeit auf 75 beschränkt. Cregg et al. sprechen von Hunderten zu überprüfenden Klonen, bis sie solche identifizierten, die zur Expression des gewünschten Proteins in der Lage waren (85).

Zweitens sollten alle weiteren Konstrukte eine Linearisierung durch das Restriktionsenzym *Pme* I zulassen, damit die Integration in den für das A33rbGFP Konstrukt bewährten Genlocus des Hefegenoms erfolgen kann.

Schließlich besteht die Möglichkeit, das bakterielle Enzym gegen die Cytosindeaminase aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* auszutauschen. Damit wären die beschriebenen möglichen Probleme auf den Ebenen der Transkription und Translation zu minimieren. Darüber hinaus zeigt die aus der Hefe stammende Cytosindeaminase eine stärkere enzymatische Aktivität im Vergleich zum bakteriellen Enzym (86), so dass diese Wahl auch einen funktionellen Vorteil für das angestrebte ADEPT-System bedeuten kann.

Um diese Lösungsansätze zu überprüfen, wurde das Vektorkonstrukt pPIC 9 K-A33rbCDy kloniert (Ergebnisse 3.12.), in dem die bakterielle Cytosindeaminase (CD) gegen diejenige aus *Saccharomyces cerevisiae* (CDy) ausgetauscht wurde. Da sich das Expressionsverhalten von *Saccharomyces cerevisiae* und *Pichia pastoris* sehr ähnlich ist (87), wurde durch diesen Wechsel die DNA-Sequenz des zu exprimierenden Fusionsantikörpers an den Wirtsorganismus angepasst, so dass eventuelle Hindernisse der Transkription und Translation dadurch minimiert werden sollten.

Darüber hinaus wurde dieses Konstrukt so gestaltet, dass es wieder die Linearisierung des Vektors durch das Restriktionsenzym *Pme* I erlaubt, womit die Integration in den selben Genlocus des Hefegenoms erfolgen kann wie bei dem erfolgreich exprimierten A33rbGFP-Konstrukt.

Nach diesen Veränderungen des Fusionskonstrukts in ein an den Hefeorganismus adaptiertes Protein, ist ggf. nach Analyse von mehreren hundert Klonen die Expression eines

A33rbCD Fusionsantikörpers für die antikörpergesteuerte Enzym-Prodrug-Therapie mit großer Wahrscheinlichkeit zu erreichen.

Da die Cytosindeaminase in der Hefe jedoch ein intrazelluläres Enzym ist, besteht allerdings nun die Möglichkeit, dass dieses Konstrukt trotz der vorangestellten alpha-Sekretionssequenz nicht in das Medium sezerniert wird, und eine Aufreinigung aus Zellysate notwendig wird.

Bei der Analyse der übrigen A33rbCD DNA-Abschnitte im Vergleich zur A33rbGFP DNA-Sequenz kann davon ausgegangen werden, dass weder die A33-Single-Chain-Komponente noch die Verbindungssequenz zwischen schwerer und leichter Kette einer Expression des gesamten Fusionsantikörpers limitierend entgegen steht, da diese im erfolgreich exprimierten A33rbGFP Fusionsantikörper ebenfalls verwendet wurden.

4.3. Anwendungen und Perspektiven von A33-Fusionsantikörpern

Die Expression des Fusionsantikörpers A33rbGFP zeigt einen grundsätzlich zukunftsweisenden Weg bei der Klonierung und Herstellung von rekombinanten Fusionsantikörpern. Durch das hier beschriebene Herstellungsverfahren werden stabile und klar definierte Antikörperkonstrukte synthetisiert, was durch bisher angewandte Verfahren der chemischen Konjugation nicht erreichbar war. Außerdem sind durch Antikörperkonstrukte, wie das Single-Chain-Fragment, Moleküle generierbar, die ein geringeres Molekulargewicht im Vergleich zu kompletten Antikörpern haben und somit eine verbesserte Biodistribution im Gewebe mit günstigeren Penetrationseigenschaften erwarten lassen.

Der hier vorgestellte A33rbGFP Fusionsantikörper kann im Weiteren grundsätzlich für zwei Anwendungen genutzt werden: Einerseits besteht die Möglichkeit, durch ihn die bisher relativ unbekannt Funktion und Präsentation des A33-Antigen näher zu charakterisieren. Andererseits kann er als modellhafter Fusionsantikörper und diagnostischer Marker für die Etablierung einer antikörpergesteuerten Enzym-Prodrug-Therapie verwendet werden.

4.3.1. Detektierung des A33-Oberflächenantigens durch den A33rbGFP

Fusionsantikörper

Mit dem A33rbGFP Fusionsantikörper kann die A33-Antigenpräsentation auf Zelloberflächen detektiert werden, wodurch er Bedeutung für die weitere Charakterisierung des A33-Antigens erlangt.

Um die Präsenz des A33-Antigens zu zeigen, wurden beispielhaft die Kolonkarzinomzelllinien COLO 205, CX 94, LS-174-T, HCT 116, LIM 1215 und HT 29 mit dem A33rbGFP Fusionsantikörper inkubiert.

Dabei lassen sich grundsätzlich zwei verschiedene Muster der Fluoreszenzzunahme unterscheiden. Die Zelllinien LIM 1215, COLO 205 und LS-174-T zeigten eine starke Zunahme der Fluoreszenz nach der Inkubation mit dem A33rbGFP Fusionsantikörper gegenüber ihrer jeweiligen Eigenfluoreszenz. Im Gegensatz dazu war bei den Zelllinien HT 29, CX 94, HCT 116 nur eine geringe Zunahme zu messen. Dies zeigt, dass alle getesteten Zelllinien das A33-Antigen auf ihrer Oberfläche präsentieren, wobei die Zelllinien LIM 1215, COLO 205 und LS-174-T eine im Vergleich zu den anderen Zelllinien höhere A33-Antigendichte aufweisen.

Die generelle Fluoreszenzzunahme aller Kolonkarzinomzelllinien nach Inkubation mit dem A33rbGFP Fusionsantikörper weist auf die bereits beschriebene Beobachtung hin, dass alle epithelialen Zellen des Gastrointestinaltrakts eine basale A33-Antigenpräsentation zeigen und somit keine der hier verwendeten Kolonkarzinomzelllinie als absolut A33-negativ anzusehen ist (88).

Ein überraschendes Ergebnis zeigte sich jedoch, wenn das Binden des A33rbGFP Fusionsantikörpers mit einem kompletten A33-IgG-Antikörper blockiert wurde, um mit der dadurch erreichten Fluoreszenzabnahme im Vergleich zum unblockierten Ergebnis die Spezifität der A33rbGFP-Bindung zu ermitteln (Abb. 4.2): Bei der Zelllinie LIM 1215 waren ca. 75% der mit dem A33rbGFP Fusionsantikörper erreichten Fluoreszenzzunahme durch vorherige Inkubation mit dem IgG-Antikörper zu blockieren, womit gezeigt wurde, dass dieser Anteil der Fluoreszenzzunahme durch spezifische Bindung des Fusionsantikörpers an das A33-Antigen zu Stande kamen. Dies bestätigt Ergebnisse von Simpson et al., die eine A33-Antigenpräsentation auf dieser Zelllinie beschrieben (75). Dagegen konnte bei den Zelllinien COLO 205, CX 94, LS-174-T, HCT 116 und HT 29 nur eine deutlich geringere

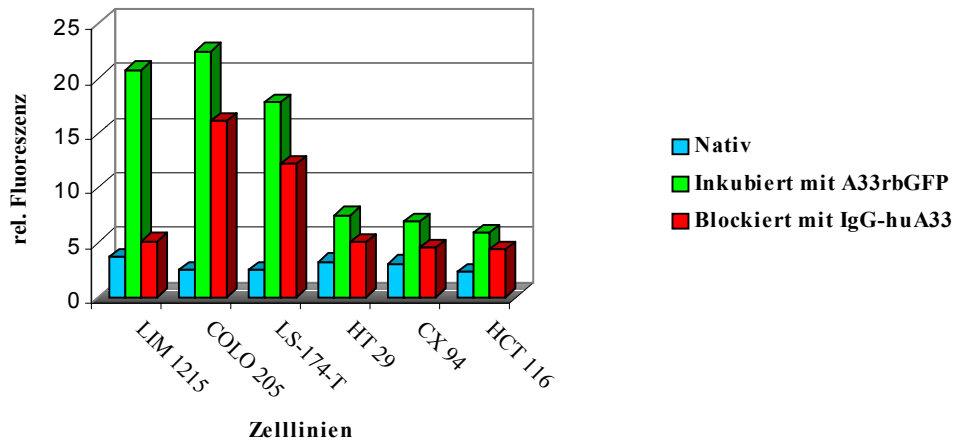


Abb. 4.2. Grafische Darstellung der Fluoreszenzmessungen verschiedener Zelllinien aus den Ergebnissen der Tabelle 3.1.: Hierbei ist die native Autofluoreszenz (blau) sowie die relative Fluoreszenz nach der Inkubation mit dem A33rbGFP Fusionsantikörper (grün) aufgetragen. Weiterhin ist die relative Fluoreszenz dargestellt, die nach vorheriger Blockierung mit dem A33-IgG und anschließender Inkubation mit dem A33rbGFP Fusionsantikörper (rot) zu messen war.

Blockierung erreicht werden, was bedeutet, dass ein Teil der Fluoreszenzzunahme durch nicht blockierbare Antikörperbindungen zustande kam.

Dieses Ergebnis könnte dadurch erklärt werden, dass im A33rbGFP-Konstrukt verwendete Single-Chain-Fragment an ein anderes Epitop des A33-Zielantigens bindet als der IgG-Antikörper (54). Demnach würden im Gegensatz zu der Zelllinie LIM 1215 die anderen genannten Zelllinien das A33-Zielantigen so präsentieren, dass das vom A33rbGFP-Konstrukt erkannte Epitop nicht durch den gebundenen huA33-IgG-Antikörper blockiert wird. Während dies grundsätzlich eine theoretische Erklärungsmöglichkeit bleibt, erscheint es schwierig, einen hypothetischen Weg zu beschreiben, auf dem eine solche grundlegend unterschiedliche Präsentation dieser benachbarten Epitope zustande kommen sollte. Eine denkbare Möglichkeit wäre, dass das A33-Antigen in einer verkürzten Version exprimiert wird, die eines der beiden Epitope nicht enthält. Dies würde aber bedeuten, dass die beiden Epitope einerseits weit genug auseinander liegen, um bei dieser Verkürzung nicht gemeinsam betroffen zu sein, andererseits aber in der sterischen Konformation des kompletten Moleküls dicht genug beieinander liegen, um im Fall der Zelllinie LIM 1215 eine gegenseitige sterische Inhibition der bindenden Antikörper zu erlauben.

Die mit dem A33rbGFP Fusionsmolekül möglichen Beobachtungen des A33-Antigens auf der Zelloberfläche lenken den Blick auf die bis jetzt noch weitgehend ungeklärten Fragen der

Funktion und die Art der Präsentation des A33-Antigens, die zugleich einen weiteren, plausibleren Erklärungsansatz für die scheinbar geringe Blockierbarkeit der Bindung des A33rbGFP Fusionsantikörpers liefern.

Van Niel beschreibt die A33-Antigenpräsentation für die Zelllinie HT 29, die hier nur eine geringe und als basal zu wertende A33-Präsentation aufgrund der Fluoreszenzergebnisse zeigte. Danach ist sie das Resultat der Bewegung von Exosomen, deren Fusionen mit der äußeren Zellmembran neue A33-Antigene an die Zelloberfläche befördern (89), so dass das A33-Antigen einer ständigen Erneuerung auf der Zelloberfläche unterliegt. Dieser stetige Transport des Antigens auf die Zelloberfläche könnte die Beobachtung erklären, dass bei einigen Zelllinien die Fluoreszenzzunahme nicht blockierbar war. Nach Beendigung der Inkubation mit dem blockierenden A33-IgG Antikörper fusionieren neue A33-Antigen-tragende Exosomen mit der Zelloberfläche und stellen so unblockierte A33-Antigen-Moleküle bereit, an die dann der A33rbGFP Fusionsantikörper binden kann.

Diese Frage könnte in weiteren Experimenten mit dem A33rbGFP Fusionsantikörper geklärt werden, indem nach der Blockierung verschieden lange Zeitintervalle gewählt werden, auf die die Inkubation mit dem A33rbGFP Fusionsantikörper folgt. Eine Bestätigung dieser Hypothese zum Exosomen-Transfer würde die Beobachtung liefern, dass mit zunehmendem Zeitintervall zwischen blockierender Vorinkubation und anschließender Inkubation mit dem A33rbGFP Fusionsantikörper der Fluoreszenzunterschied gegenüber dem unblockierten Ansatz abnimmt.

Es gibt darüber hinaus auch Hinweise, dass das A33-Antigen von der Zelloberfläche ins Zellinnere gelangt. Diese Internalisierung in Form von Membranvesikeln mit dem A33-Antigen konnte durch radiomarkierte IgG-Antikörper gezeigt werden (90).

Beide Beobachtungen zusammen stützen die Vermutung, dass das membrangebundene A33-Antigen einem Kreislauf von Präsentation auf der Zelloberfläche und Zirkulation in Vesikeln im Zellinneren unterliegt. Bei klinischen Studien mit radiomarkiertem A33-IgG Antikörper konnte initial eine Markierung des ganzen Gastrointestinaltrakts beobachtet werden, die sich im Laufe von Tagen auf das Tumorgewebe fokussierte (52). Die relative Anreicherung des radiomarkierten A33-Antikörpers im Tumorgewebe könnte ebenfalls durch diese Zirkulation des A33-Antigens erklärt werden. Dies führt zu der Hypothese einer veränderten Zirkulation des A33-Antigens im Tumorgewebe, die bewirkt, dass der radiomarkierte A33-Antikörper länger auf oder in der Tumorzelle verweilt als in normalen A33-positiven Zellen.

Die postulierte A33-Antigenzirkulation wäre mit dem A33rbGFP Fusionsantikörper zu verfolgen. Der A33rbGFP Fusionsantikörper hat außerdem gegenüber dem IgG-Antikörper den Vorteil einer geringeren Molekülgröße, wodurch räumliche Behinderungen des Antigen-Antikörper-Komplexes im Zellinneren minimiert würden. Im Rahmen des Gesamtprojekts müssten geeignete Methoden zur extra- und intrazellulären Identifizierung des gebundenen A33rbGFP Fusionsantikörpers an das A33 Antigen etabliert werden. Hierfür eignete sich insbesondere die konfokale Mikroskopie (91), die eine intrazelluläre Auflösung und damit die Verfolgung des fluoreszierenden Antigen-Antikörper-Komplexes erlaubt.

4.3.2. Der A33rbGFP Fusionsantikörper als Werkzeug zur Etablierung einer antikörpergesteuerten Enzym-Prodrug-Therapie

Für pharmakokinetische Untersuchungen des ADEPT-Konzepts im Tierexperiment oder später in klinischen Studien ist ein Fusionsantikörper zu fordern, der als Modell für den bifunktionellen Effektorfusionsantikörper dienen kann. Der A33rbGFP Fusionsantikörper ist im Gegensatz zum A33rbCD Fusionsantikörper durch seine Fluoreszenzeigenschaften unproblematisch auf seine beiden Funktionen zu untersuchen und somit für ein Pilotprojekt optimal geeignet.

Durch den A33rbGFP Fusionsantikörper könnten außerdem im Einzelfall prospektiv die Erfolgsaussichten einer antikörpergesteuerten Enzym-Prodrug-Therapie für den jeweiligen Patienten festgestellt werden, indem A33rbGFP zur *in-vitro*-Analyse der Präsentation des A33-Zielantigens auf den Tumorzellen eingesetzt wird. Je höher die zu messende Fluoreszenzzunahme wäre, desto besser wäre dieser Tumor für die antikörpergesteuerte Enzym-Prodrug-Therapie geeignet, da die Therapie dann auf den Tumor fokussiert werden kann. Diese mögliche Analyse der A33-Antigenpräsentation wurde hier beispielhaft mit der Fluoreszenzmikroskopie und der Durchflusszytometrie vorgestellt.

Das Bindungsverhalten des fluoreszenzzytometrisch detektierbaren A33rbGFP Fusionsantikörpers lässt weiterhin eine Abschätzung und Vorhersagbarkeit des Verhaltens eines bifunktionellen Fusionsantikörpers in künftigen Tierexperimenten und ADEPT-Studien zu, da er in seiner grundsätzlichen Struktur und Größe einem bifunktionellen ADEPT-

Effektor-Fusionsantikörper wie dem oben vorgestellten geplanten Konstrukt von A33-Single-Chain-Fragment mit fusionierter Cytosindeaminase entspricht.

Bereits bei tierexperimentellen Modellen stellt sich die Frage nach der Biodistribution der Fusionsantikörper im Gesamtorganismus und speziell im Tumorgewebe. Die Penetration eines Tumors durch ein Makromolekül lässt sich in mehrere Abschnitte über einen relativ langen Zeitraum in der Größenordnung von Stunden bis Tagen unterteilen (92). Dabei muss der Fusionsantikörper ausgehend vom Blutstrom mehrere Barrieren auf dem Weg zum Zielantigen überschreiten: Zunächst muss er das Blutgefäß durch die Gefäßwände verlassen und wird anschließend durch Diffusion und Konvektion durch den interstitiellen Raum bewegt (93). Dieses geschieht entgegen einem intratumorösen Gewebedruck, der unterschiedlich für verschiedene Gewebetypen und Tumorarten ist (94). Dabei kommt es auch zu einer Veränderung des metabolischen Milieus, das sich an verschiedenen Orten des Tumors abhängig von dessen Nekrosegrad zum Beispiel in Bezug auf den pH-Wert oder den Sauerstoffgehalt unterscheiden kann (95). Alle diese Barrieren haben einen teils schlecht vorhersagbaren Einfluss auf die Penetration des Tumorgewebes und auf die Bindung an das Antigen.

Ein in diesem Zusammenhang zu untersuchender Punkt wäre die Abhängigkeit der applizierten Dosis eines Fusionsantikörpers und dessen nachfolgende Distribution über diese verschiedenen Barrieren (96). Diese Beobachtungen könnten mit einem Mausmodell eines implantierten Kolonkarzinom-Xenotransplantats realisiert werden (97), indem Mäusen der A33rbGFP Fusionsantikörper injiziert wird, und sie nach verschiedenen langen Zeitintervallen auf die Fluoreszenzverteilung im Tumor sowie in Blut und Organen untersucht werden.

Während radiomarkierte Antikörperkonstrukte die Beobachtung der Biodistribution im Gesamtorganismus erlauben, ist der A33rbGFP Fusionsantikörper als Modell durch seine Fluoreszenz direkt beobachtbar, so dass mit ihm die Penetration des Tumors histologisch analysiert werden kann. Da bei dieser Anwendung immer der A33rbGFP Fusionsantikörper selbst beobachtet würde, können interferierende Störgrößen minimiert werden, wie zum Beispiel bei immunhistochemischen Nachweisverfahren das unspezifische Binden eines sekundären Antikörpers an kreuzreaktiven Strukturen.

Durch dieses Mausmodell könnten Erfahrungen gesammelt werden, die zu einer Optimierung der Antikörperkonstrukte und ihrer Applikationsweise führen, um eine hohe Konzentration des Fusionsantikörpers im Tumor und eine geringe in anderen Organsystemen zu erreichen.