

***On Slide* Selektion auf Formalin-fixiertem und in
Paraffin-eingebettetem (FFPE) Patientengewebe zur
Generierung spezifischer Antikörper mittels Phage
Display Technologie**

***On slide selection on formalin-fixed paraffin-
embedded (FFPE) patient tissue biopsies for the
generation of specific antibodies by phage display
technology***

Inauguraldissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Fachbereich Biologie und Chemie
der Justus-Liebig Universität Gießen

vorgelegt von
Andre ten Haaf, M. Sc.
aus Krefeld
11.08.2015

Gutachter:
Prof. Dr. Michael Martin
Prof. Dr. Stefan Gattenlöhner

Danksagung

Meine Promotion wäre ohne die Unterstützung verschiedener Personen nicht möglich gewesen, weshalb ich diesen im Folgenden meinen Dank aussprechen möchte.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Stefan Gattenlöhner, Leiter des Instituts für Pathologie, für die Möglichkeit meine Promotion in seinem Institut durchführen zu können, die Unterstützung während meiner Arbeit und die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Michael Martin für die Bereitschaft meine externe Promotion am Institut für Pathologie als Mitglied des Fachbereichs 8 - Biologie und Chemie - zu unterstützen und zu begutachten.

Außerdem danke ich Frau Prof. Dr. Tina Trenczek und Herrn Prof. Dr. Andre Menke für die Bereitschaft als Prüfer in meiner Disputation zu fungieren.

Besonders möchte ich mich bei Dr. Mehmet Kemal Tur für die Vergabe dieses interessanten Themas und die Betreuung meiner Arbeit bedanken. Außerdem für die hervorragende Unterstützung und die anregenden Gespräche.

Ganz besonders danke ich meiner Kollegin Sibylle Pscherer für die vielen hilfreichen Ideen, Unterstützung bei den Versuchen und netten Gesprächen im Labor.

Dem gesamten Institut für Pathologie möchte ich für die freundliche Aufnahme und Unterstützung während meiner Promotion danken. Hierbei vor allem Sebastian Schäfer, Ann-Kathrin Jestädt, Cindy Arnold, Frank Dönges, Andrea Jung, Yvonne Schichowski, Dr. Jutta Bradtke und Alexander Brobeil.

Prof. Dr. Dr. Stefan Barth danke ich für die Möglichkeit, die Immuntoxin-Experimente in seiner Abteilung am Fraunhofer Institut in Aachen durchführen zu dürfen. Dr. Rajkumar Savai vom Max Planck Institut für Herz- und Lungenforschung in Bad Nauheim danke ich für Bereitstellung der SCLC Zelllinien und Prof. Dr. Claudia Rössig von der pädiatrischen Hämatologie und Onkologie des Universitätsklinikums Münster für die HEK293T und NK92-C1 Zellen.

Des weiteren danke ich ganz besonders meiner Freundin Dr. Nadja Thomas für die hilfreichen Tipps, zahlreichen Diskussionen und Korrekturen an meiner Arbeit. Außerdem für die gesamte Unterstützung während der Promotion.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Mutter, meiner Schwester Nadja und meinen Freunden bedanken, die mich immer unterstützt und motiviert haben.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, die vorgelegte Thesis selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt zu haben, die ich in der Thesis angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Thesis erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der ‚Satzung der Justus-Liebig-Universität zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis‘ niedergelegt sind, eingehalten. Gemäß § 25 Abs. 6 der Allgemeinen Bestimmungen für modularisierte Studiengänge dulde ich eine Überprüfung der Thesis mittels Anti-Plagiatssoftware.

Teile dieser Arbeit wurden bereits publiziert (ten Haaf *et al.*, Immunol Lett. 2015 Jun 2;166(2):65-78, PMID: 26045318) und auf einem wissenschaftlichen Kongress in Berlin vorgestellt (98. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie e.V., 2014).

Gießen, den 11.08.2015

Andre ten Haaf

Zusammenfassung

Monoklonale Antikörper nehmen in der Diagnose und zielgerichteten Therapie von malignen Erkrankungen eine immer wichtigere Rolle ein. Die erfolgreichste *in vitro* Methode zur Generierung neuer, monoklonaler Antikörper ist die Phage Display Technologie. Hierbei werden aus einem Pool von an Bakteriophagen gekoppelten Antikörpern Antigen-spezifische Antikörper selektioniert. Beim Standardselektionsverfahren werden rekombinante Proteine, Antigen-transfizierte Zellen oder Tumorzelllinien als Zielantigene verwendet. Diese Antigene können sich jedoch von der natürlichen Form der Antigene in den Tumoren der Patienten unterscheiden, wodurch es zur Selektion von klinisch irrelevanten Antikörpern kommen kann. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Antikörperselektionsstrategie auf Formalin-fixiertem und in Paraffin-eingebettetem (FFPE) Patienten Routinematerial mit komplexen Antigenstrukturen etabliert. FFPE Biopsien erhalten größtenteils ihre tumorspezifischen Charakteristika, weshalb sie als ein vielversprechendes Ausgangsmaterial für die Selektion krankheitsrelevanter Antikörper erscheinen. Da es sich bei dem verwendeten Patientenmaterial um Routinebiopsate handelt, entsteht keine zusätzliche Belastung für den Patienten. Außerdem ist im Vergleich zum Standardselektionsverfahren keine aufwendige Herstellung, Aufreinigung, Lagerung oder Kultivierung des Ausgangsmaterials notwendig.

Die Etablierung der Methode erfolgte auf immobilisierten Gewebeschnitten von vier verschiedenen Patientenbiopsaten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom (SCLC). Die kommerziellen, humanen scFv Antikörperbibliotheken Tomlinson I und J wurden zunächst auf gesundem Lungengewebe depletiert, um so tumorirrelevante Antikörper zu entfernen. Anschließend erfolgte die Selektion auf SCLC-Gewebeschnitten. Zur Erhöhung der Epitopzugänglichkeit wurden vor der Depletion und Selektion verschiedene Antigendemaskierungsverfahren angewendet. Hierdurch konnte eine Serie von neuen Antikörpern selektioniert werden, deren Tumorspezifität *in vitro* im ELISA und in der Durchflusszytometrie auf den SCLC Zelllinien NCI-H69, NCI-H82 und DMS 273 verifiziert werden konnte. Bei der näheren Charakterisierung von drei der selektionierten Antikörper konnte zusätzlich die spezifische Bindung *ex vivo* auf Tissue Microarrays mit 35 verschiedenen SCLC Biopsien im Vergleich zu 20 verschiedenen gesunden Organen bestätigt werden. Nach Analyse des Internalisierungsverhaltens der drei scFv's, wurden diese zur Herstellung von rekombinanten Immuntoxinen an eine verkürzte Form des *Pseudomonas* Exotoxins A (ETA') fusioniert. Das zytotoxische Potenzial von zwei der drei rekombinanten Immuntoxine konnte durch Zellviabilitäts- (XTT) und Apoptose-Assays (Annexin V) verifiziert werden, wobei die mittlere inhibitorische Dosis (IC₅₀) im unteren nanomolaren Bereich lag. Somit konnte ein möglicher diagnostischer und therapeutischer Einsatz der selektionierten Antikörper bestätigt werden.

Bei der *On Slide* Selektion handelt es sich um die erste, Phage Display basierte Antikörperselektion direkt auf Patienten FFPE Routinematerial, welches auf Glasobjektträgern immobilisiert wurde und dessen komplexe Antigenstrukturen durch verschiedene Demaskierungsverfahren freigelegt wurden.

Summary

Monoclonal antibodies play a major role in diagnostic and targeted therapy of malignant disease. The most successful *in vitro* method for generation of new monoclonal antibodies is the phage display technology, in which an antigen specific antibody can be selected from a pool of antibody bearing phage particles. Standard phage display panning uses purified proteins, antigen-transfected cells or tumor cell lines as target antigen. However, these antigens may differ from the antigens in malignant tumors in patients, thus selection of clinically-irrelevant antibodies is not uncommon. In this study an antibody selection strategy on formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) patient routine material with complex antigenic structures has been established. FFPE biopsies mainly preserve their tumor-specific characteristics and therefore seem to be a much more reliable material for the selection of clinically relevant antibodies. Because biopsies are taken routinely for diagnosis, there is no additional stress for the patient. In addition, there is no need for laborious production, purification, storage or cultivation of the starting material.

The establishment of the method was achieved on immobilized tissue sections of four different patient biopsies with small cell lung cancer (SCLC). The commercial human scFv antibody libraries Tomlinson I and J were depleted on normal lung tissue to subtract tumor-irrelevant antibodies. Afterwards selection was performed on SCLC tissue slides. To enhance antigen accessibility different epitope retrieval procedures were applied before depletion and selection. A series of novel antibodies was isolated and their tumor-specificity was confirmed *in vitro* by ELISA and by flow cytometry using the SCLC cell lines NCI-H69, NCI-H82 and DMS 273. Further characterization of three selected antibodies additionally revealed specific binding on tissue microarrays containing 35 different SCLC samples and 20 types of normal organs *ex vivo*. We monitored the internalization of these three selected scFv antibodies and fused them with *Pseudomonas* exotoxin A (ETA¹) to produce recombinant immunotoxins. The cytotoxic potential of two of the three recombinant immunotoxins was verified by cell viability (XTT) and apoptosis assays (Annexin V), achieving half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) values in low nanomolar range. Thus, a potential diagnostic and therapeutic application of the selected antibodies was confirmed.

The described *On Slide* Selection is the first phage display based antibody selection directly on patient FFPE routine material immobilized on glass slides in which the complex antigen structures were revealed with different epitope retrieval techniques.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	I
Selbstständigkeitserklärung	II
Zusammenfassung.....	III
Summary	IV
Inhaltsverzeichnis.....	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Antikörper	1
1.2 Antikörper in der Diagnose und Therapie von Tumoren	4
1.3 Generierung spezifischer Antikörper mittels Phage Display	6
1.3.1 Aufbau von Bakteriophagen.....	6
1.3.2 Die Phage Display Technologie.....	7
1.3.3 Die Tomlinson Antikörperbibliotheken I und J.....	10
1.3.4 Der Selektionsprozess	11
1.4 <i>On Slide</i> Selektion	12
1.5 Immunokonjugate	14
1.5.1 Radioimmunokonjugate	14
1.5.2 Antikörper-Wirkstoff-Konjugate.....	15
1.5.3 Immuntoxine	17
1.6 Kleinzelliges Bronchialkarzinom (SCLC).....	18
1.6.1 Epidemiologie und Ätiologie	18
1.6.2 Diagnose	19
1.6.3 Tumorklassifizierung.....	19
1.6.4 Therapie und Prognose	21
1.7 Zielsetzung.....	23
2 Material	25
2.1 Geräte & Software.....	25

2.2	Verbrauchsmittel & Reagenzien.....	26
2.3	Puffer, Lösungen & Medien.....	28
2.4	Molekulargewichtsmarker	30
2.5	Enzyme & Reaktionskits	30
2.6	Antibiotika	31
2.7	Antikörper	31
2.8	Vektoren.....	31
2.9	Primer.....	35
2.10	Zelllinien, Bakterienstämme & Patientenmaterial.....	36
3	Methoden.....	37
3.1	Zellkultur.....	37
3.1.1	Kultivierung der verwendeten Zellen	37
3.1.2	Kryokonservierung von Zellen.....	38
3.1.3	Herstellung von peripheren mononukleären Zellen aus humanem Blut.....	38
3.1.4	Transfektion von HEK293T Zellen.....	39
3.1.5	Herstellung von Membranfragmenten	40
3.2	Molekularbiologische Methoden	40
3.2.1	Polymerase-Kettenreaktion.....	40
3.2.2	Agarose-Gelelektrophorese	41
3.2.3	Bestimmung des Nukleinsäuregehalts und der Reinheit	42
3.2.4	Sequenzierung.....	42
3.2.5	Plasmidpräparation	43
3.2.6	Restriktionsverdau und Klonierung von DNA-Fragmenten.....	43
3.2.7	Hitzeschocktransformation von <i>E. coli</i>	44
3.3	Proteinbiochemische Methoden.....	45
3.3.1	Prokaryotische Antikörperexpression	45
3.3.2	Aufreinigung der Antikörperfragmente mittels Immobilisierter Metallchelate Affinitätschromatographie (IMAC).....	46
3.3.3	Einengen und Umpuffern der Antikörperfragmente	47

3.3.4	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	47
3.3.5	Coomassie-Färbung	48
3.3.6	Western Blot	48
3.3.7	Kolorimetrische und photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration	49
3.4	Phage Display	49
3.4.1	Produktion scFv-präsentierender Phagen	50
3.4.2	<i>On Slide</i> Selektion	51
3.4.3	Polyklonale Phagen-Durchflusszytometrie	53
3.4.4	Polyklonaler Phagen-ELISA	54
3.4.5	Monoklonaler Phagen-ELISA	55
3.4.6	Ortsgerichtete Mutagenese	56
3.5	Herstellung und Charakterisierung von scFv-Fc Fusionsproteinen	57
3.5.1	Umwandlung der scFv's in Fc-Fusionsproteine	57
3.5.2	ELISA-basierte Bindungsanalyse der scFv-Fc Fusionsproteine	58
3.5.3	Durchflusszytometrie-basierte Bindungsanalyse der scFv-Fc Fusionsproteine	58
3.5.4	Analyse des Internalisierungsverhaltens der Antikörperfragmente	59
3.6	Herstellung und Charakterisierung von Fab-Fragmenten	60
3.6.1	Umwandlung der scFv's in Fab-Fragmente	60
3.6.2	Durchflusszytometrie-basierte Bindungsanalyse der Fab-Fragmente	60
3.6.3	Immunhistochemische Bindungsanalyse der Fab-Fragmente	61
3.7	Herstellung und Charakterisierung von rekombinanten Immuntoxinen	62
3.7.1	Herstellung rekombinanter Immuntoxine	62
3.7.2	Analyse der proliferationshemmenden Wirkung	63
3.7.3	Analyse der Apoptoseinduktion	64
3.8	Datenanalyse	65
4	Ergebnisse	66
4.1	Selektion SCLC-spezifischer Antikörperfragmente	66
4.1.1	Überprüfung der Antikörperbibliotheken Tomlinson I und J	66

4.1.2	Anreicherung SCLC-spezifischer Antikörperfragmente	67
4.2	Polyklonale Analyse der selektionierten Antikörperfragmente	68
4.3	Monoklonale Analyse der selektionierten Antikörperfragmente	71
4.4	Herstellung und Analyse löslicher scFv-Fc Fusionsproteine.....	73
4.4.1	Herstellung der scFv-Fusionsproteine	73
4.4.2	Bindungsanalyse der scFv-Fc Fusionsproteine	75
4.4.3	Untersuchung des Internalisierungsverhaltens.....	78
4.5	Herstellung und Analyse von Fab-Antikörperfragmenten	81
4.5.1	Herstellung der Fab-Antikörperfragmente.....	81
4.5.2	Bindungsanalyse der Fab-Antikörperfragmente	83
4.5.3	Analyse der Trypsinsensitivität der Antigene.....	84
4.5.4	Immunhistochemie der Fab-Fragmente.....	85
4.6	Herstellung und Analyse von rekombinanten Immuntoxinen	88
4.6.1	Herstellung der Immuntoxine	88
4.6.2	Bindungsanalyse der Immuntoxine.....	89
4.6.3	Zytotoxizitätsanalysen der rekombinanten Immuntoxine	90
4.7	Übersicht der Antikörper-Charakterisierung.....	93
5	Diskussion.....	95
5.1	FFPE Gewebe als Ausgangsmaterial für die Antikörperselektion	95
5.2	Die <i>On Slide</i> Selektion.....	98
5.3	Umwandlung der selektionierten Binder in verschiedene Antikörperformate.....	100
5.4	Therapeutischer Einsatz der rekombinanten Immuntoxine	104
5.5	Antigenidentifizierung.....	107
6	Ausblick.....	108
Anhang	110
	Mutageneseprimer.....	110
	Literaturverzeichnis.....	111
	Abkürzungsverzeichnis.....	120

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	124
Tabellenverzeichnis.....	125
Eigene Veröffentlichungen.....	126

1 Einleitung

1.1 Antikörper

Seit der Entdeckung von Antikörpern (Immunglobuline, Ig) im Serum geimpfter Personen durch Emil von Behring und Shibasaburo Kitasato 1890 ist bekannt, dass Antikörper für die Erkennung von pathogenen Erregern verantwortlich sind. Sie bilden einen wichtigen Teil der adaptiven, humoralen Immunantwort bei der spezifischen Bekämpfung von Pathogenen. Ihre Aufgaben lassen sich wie folgt zusammenfassen [1]:

1. Neutralisierung: Durch Anlagerung von Antikörpern an Viren oder bakteriellen Toxinen werden diese Pathogene an der Bindung ihrer Zielzelle gehindert
2. Opsonierung: Die Bindung von Antikörpern auf der Oberfläche von Pathogenen lockt Zellen des angeborenen Immunsystems an und regt diese zur Phagozytose der Pathogene an
3. Aktivierung des Komplementsystems: Durch Bindung von Antikörpern auf Pathogenen werden Bestandteile des Komplementsystems aktiviert, wodurch die Pathogene für Abwehrzellen opsoniert oder direkt durch das Komplementsystem lysiert werden

Jeder Antikörper besteht aus zwei identischen schweren und zwei identischen leichten Ketten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (gilt für die Isotypen IgA, IgD & IgG). Ein Antikörper kann daher zwei identische Antigene gleichzeitig binden und ist somit bivalent. Die schweren Ketten bestehen aus einem variablen N-terminalen Teil und drei (bei IgA, IgD, IgG) bzw. vier (bei IgE, IgM) konstanten Teilen, die leichten Ketten aus einem variablen und einem konstanten Teil. Die variablen Teile der schweren und der leichten Kette sind zusammen für die spezifische Antigenerkennung zuständig, der konstante Teil übernimmt Effektorfunktionen, indem er mit Fc-Rezeptoren auf Zelloberflächen interagiert. Als B-Zellrezeptoren (BZR) liegen die Antikörper Membrangebunden vor und haben dann keine Effektorfunktion, da sich der Fc-Teil innerhalb der Membran befindet. Die BZR sorgen für die Erkennung von Antigenen durch die B-Zelle und können Signale in der B-Zelle auslösen. Antikörper sind modular aufgebaut, weshalb die Funktion der einzelnen Teile unabhängig von einander ist. Durch diesen modularen Aufbau können mit Hilfe rekombinanter Technologien verschiedene Antikörperdomänen mit einander kombiniert und anwendungsspezifische Antikörper generiert werden. Abb. 1 zeigt den Aufbau eines IgG Antikörpers. Die leichten Ketten werden in Kappa (κ) und Lambda (λ) unterteilt und die schweren abhängig von ihrem konstanten Teil in fünf Isotypen (IgA, IgD, IgE, IgG & IgM). Das Verhältnis von κ : λ beträgt bei Menschen 2:1, bei Mäusen 1:2 und bei Rindern 1:20, wobei der Grund für die Unterschiede nicht bekannt ist [1]. Der variable Teil

enthält drei hypervariable Regionen, die Complementarity Determining Regions (CDR's), die von vier weniger variablen Regionen, den Framework Regions (FWR's), umgeben sind. Die drei CDR's der schweren Kette lagern sich mit den CDR's der leichten Kette zusammen und bilden die Antigen-Bindungsdomäne, während die FWR's für die Stabilität der Antikörper zuständig sind. Die Antigen-Bindungsdomäne wird auch als Paratop bezeichnet, da sie hoch spezifisch ein komplementäres Epitop bindet. Bei der Bindung zwischen Antikörper und Antigen handelt es sich um eine reversible, nicht-kovalente Interaktion. Die Epitope, die von Antikörpern erkannt werden, können dabei linear oder konformativ vorliegen. Die Bindung eines Antikörpers zu seinem Antigen ist hoch spezifisch, wobei die Gesamtbindekraft als Avidität bezeichnet wird. Sie wird durch die Affinität und die Valenz der Bindung (mono-, bi- oder polyvalent) bestimmt.

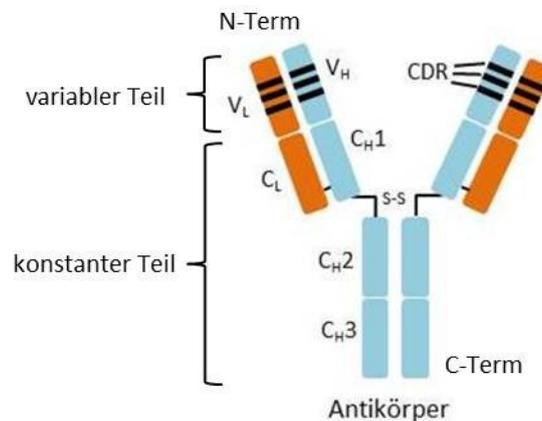


Abb. 1: Schematische Darstellung eines IgG Antikörpers

Ein Antikörper besteht aus zwei identischen leichten und schweren Ketten, die über Disulfidbrücken verbunden sind. Die einzelnen Ketten setzen sich aus einem variablen und einem konstanten Teil zusammen, wobei der variable Teil für die spezifische Antigenerkennung zuständig ist und der konstante Teil Effektorfunktionen übernimmt.

V_L: variabler Teil der leichten Kette; V_H: variabler Teil der schweren Kette; C_L: konstanter Teil der leichten Kette; C_H: konstanter Teil der schweren Kette; CDR: Complementarity Determining Region; N-Term: Aminoterminales Ende; C-Term: Carboxyterminales Ende; S-S: Disulfidbrücke

Die Bildung der Antikörper erfolgt in B-Zellen, wobei sie zunächst Membrangebunden als B-Zell Antigenrezeptoren auf der Oberfläche vorkommen [2]. Jede B-Zelle produziert nur Antikörper mit einer einzigen, individuellen Spezifität, dennoch umfasst das Antikörperrepertoire im Menschen mindestens 10^{11} verschiedene Antikörperspezifitäten, so dass theoretisch für jedes Antigen ein passender Antikörper vorhanden ist [1]. Zunächst wurde von der Keimbahntheorie ausgegangen, bei der man annahm, dass für jeden Antikörper ein separates Gen vorhanden sei. Hierfür würden für die verschiedenen Antikörper jedoch mehr Gene benötigt, als im gesamten Genom vorhanden sind [2]. 1976 entdeckte Susumu Tonegawa, dass der variable Teil der Antikörper während der Entstehung der B-Zellen im Knochenmark aus einem Set von Genabschnitten zusammengesetzt wird, wobei die

Auswahl der Gensegmente zufällig erfolgt. Hierdurch lässt sich aus einer limitierten Anzahl von Gensegmenten eine große Anzahl verschiedener Antikörper herstellen. Dieser Prozess wird als Genrearrangement oder somatische DNA Rekombination bezeichnet und ist ein Hauptgrund für die große Variabilität. Der variable Teil der leichten Kette setzt sich hierbei aus einem V („variable“) Gensegment und einem J („joining“) Gensegment zusammen, während der variable Teil der schweren Kette zusätzlich zwischen V und J noch ein D („diversity“) Gensegment enthält. Den Übergang der einzelnen Gensegmente bildet die CDR3, weshalb diese Region auch die höchste Variabilität aufweist [3]. Tabelle 1 zeigt die Anzahl der V, D und J Gensegmente der einzelnen Ketten ohne Pseudogene [1, 2]. Die Gensegmente für die leichte Kette κ befinden sich auf Chromosom 2, die für die leichte Kette λ auf Chromosom 22 und die der schweren Kette auf Chromosom 14.

Tabelle 1: Anzahl an V, D und J Gensegmenten [1]

	Leichte Kette κ	Leichte Kette λ	Schwere Kette
V	40	30	65
D	0	0	27
J	5	4	6

Der Zusammenbau der Gensegmente ist ungenau, wodurch zusätzliche Nukleotide zwischen den Segmenten hinzugefügt oder entfernt werden. Diesen Prozess bezeichnet man als Junctional Diversity, was maßgeblich zur weiteren Variabilität der Antikörper beiträgt. Außerdem kann es vorkommen, dass zwei D Gensegmente oder eins in reverser Orientierung eingebaut werden, wodurch die schwere Kette zusätzlich variabler wird [3]. Nachdem V und D bzw. V, D und J während der somatischen DNA Rekombination zusammengesetzt wurden, erfolgt die Transkription des Antikörpergens in ein primäres RNA-Transkript und erst beim Spleißen durch entfernen der Introns die Anlagerung des konstanten Teils. Zunächst entstehen nur IgM und IgD, da in naive B-Zellen für die schwere Kette nur die ersten beiden konstanten Genabschnitte (C_{μ} bzw. C_{δ}) bei der Bildung des primären RNA-Transkripts verwendet werden [1]. Im Laufe einer Antikörperantwort werden von aktivierten B-Zellen durch irreversible DNA-Rekombinationen auch die weiteren konstanten Genabschnitte (C_{γ} , C_{ϵ} bzw. C_{α}) exprimiert. Durch diesen Isotypwechsel entstehen die unterschiedlichen Isoformen IgA, IgE und IgG, wobei der Wechsel durch externe Signale wie z.B. Zytokine stimuliert wird. Jede schwere Kette kann mit jeder leichten Kette einen Antikörper bilden, was als kombinatorische Diversität bezeichnet wird und zu zusätzlicher Variabilität führt [1, 2]. Für weitere Variabilität sorgt die somatische Hypermutation oder auch Affinitätsreifung während der klonalen Expansion der B-Zelle nach Antigenkontakt. Hierbei kommt es zu zahlreichen Punktmutationen im variablen Teil des Antikörpers, wodurch neue Antigenrezeptoren auf der B-Zelle entstehen. Bei gleicher Spezifität, aber höherer Affinität des veränderten Antikörpers zum entsprechenden Antigen bindet diese B-Zelle das Antigen und nimmt es auf. Anschließend wird das

Antigen von der B-Zelle in Peptide gespalten und auf ihrer Oberfläche präsentiert. T-Helferzellen erkennen die präsentierten Peptide und senden der B-Zelle Aktivierungssignale, wodurch die B-Zelle zur Proliferation und zur Differenzierung in Gedächtnis- oder Plasmazellen angeregt wird. Die Plasmazellen sezernieren anschließend die hoch affinen Antikörper. Zusammenfassend sind also vier Prozesse für die Antikörperviariabilität verantwortlich:

1. Somatische DNA Rekombination
2. Junctional Diversity
3. Kombinatorische Diversität
4. Somatische Hypermutation

Die hohe Spezifität von Antikörpern zu krankheitsassoziierten Antigenen ermöglicht deren Einsatz in der Diagnose und Therapie von Erkrankungen. Ihr modularer Aufbau erlaubt zusätzlich durch rekombinante Technologien die Herstellung von anwendungsspezifischen Antikörperfragmenten, wodurch ihre Einsatzmöglichkeiten noch erweitert werden können.

1.2 Antikörper in der Diagnose und Therapie von Tumoren

Die Idee der zielgerichteten Bekämpfung von Mikroorganismen und malignen Zellen entstand bereits Ende des 19. Jahrhunderts durch Paul Ehrlich und wurde unter der Bezeichnung „*Magic Bullet*“ bekannt [4, 5]. Doch erst die Entwicklung der Hybridomatechnologie durch Köhler und Milstein 1975 ermöglichte den Einsatz monoklonaler Antikörper in der Diagnose und Therapie [6, 7]. Heutzutage bilden Antikörper die am schnellsten wachsende Klasse von biologischen Therapeutika und sind unentbehrlich in Forschung und Diagnose [8]. In Tabelle 2 werden die gängigsten diagnostischen und therapeutischen Anwendungsmöglichkeiten monoklonaler Antikörper aufgeführt.

Tabelle 2: Anwendungen monoklonaler Antikörper in der Diagnose und Therapie

Diagnostischer Einsatz	Immunhistochemie, Immunzytologie, Immunoassays, Durchflusszytometrie, Radioimmunodetektion, Szintigraphie
Therapeutischer Einsatz	Krebstherapie, Inflammation, Regulierung der Immunantwort bei Autoimmunerkrankungen und Transplantationen, Infektion

Im Jahr 1988 (in den USA schon 1986) wurde mit Muromonab (Okt3), einem murinen Antikörper gegen CD3, der erste monoklonale Antikörper für die Therapie bei Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantationen zugelassen. Murine monoklonale Antikörper zeigten jedoch eine limitierte therapeutische Wirkung [7, 9, 10]. Gründe hierfür sind HAMA Effekte (Humane-Anti-Maus-

Antikörper) aufgrund ihrer starken Immunogenität, die zu einer Immunreaktion des Körpers gegen die murinen Antikörper führt, und deren kurze Halbwertszeit im Organismus. Außerdem wirken sie im Menschen wenig zelltoxisch, da sie weder das Komplementsystem aktivieren, noch eine zellvermittelte Toxizität auslösen [7, 9]. Diese Problematik wurde durch die Humanisierung von Antikörpern, entwickelt von Greg Winter und Kollegen, teilweise überwunden [11, 12]. Durch den Austausch des murinen konstanten Teils gegen einen humanen entstehen chimäre Antikörper; bei humanisierten Antikörpern sind nur noch die CDR murin. Die Humanisierung der Antikörper sorgt dafür, dass sie viel weniger immunogen als ihre ursprüngliche, komplett murine Form sind, Effektorzellen besser rekrutieren und das Komplementsystem aktiviert wird [7, 13]. Komplett humane Antikörper können in transgenen Mäusen [14, 15] oder mit Hilfe der Phage Display Technologie hergestellt werden.

Durch die 1998 (USA 1997) erhaltene Zulassung des humanisierten Antikörpers Rituximab (MabThera) gegen CD20 bei B-Zell Lymphomen, dem ersten therapeutischen Antikörper für die Krebstherapie, und im Jahr 2000 (USA 1998) Trastuzumab (Herceptin, gegen HER2/ERBB2), dem ersten Antikörper gegen solide Tumore, entstand eine neue Strategie in der Krebsbekämpfung [4]. Seitdem zählt die antikörperbasierte Krebstherapie zu einer der erfolgreichsten und wichtigsten Behandlungsmethoden und ist eine der größten Erfolgsgeschichte der letzten 20 Jahre [5]. In Deutschland sind aktuell 40 monoklonale Antikörper für therapeutische Anwendungen zugelassen [16], über 3.000 befinden sich derzeit in klinischen Studien [17], wobei 50 % davon gegen maligne Erkrankungen gerichtet sind [18].

Die Wirkung von Antikörpern kann auf einer Aktivierung des Komplementsystems, Antikörper-abhängiger-Zellzytotoxizität (ADCC, „*antibody dependent cellular cytotoxicity*“) oder Inhibierung der Signaltransduktion durch Bindung von Rezeptoren oder sekretierten Faktoren beruhen [13]. Ein großer Vorteil von therapeutischen Antikörpern ist deren meist gute Verträglichkeit im Vergleich zu Chemotherapien [9]. Bei den Nebenwirkungen handelt es sich in der Regel um Immunreaktionen, die zu Fieber, Erkältung, Durchfall, Hautausschlag, Schwächegefühl und Übelkeit führen können, welche jedoch meist gut zu kontrollieren sind [9].

Die Entwicklung rekombinanter Technologien und genetischer Modifikationen von Antikörpern ermöglicht die Generierung und Produktion fein abgestimmter monoklonaler Antikörper, weshalb diese eine wichtige Alternative zur Hybridomatechnik bilden [7, 10, 19]. So lassen sich rekombinante Antikörper mit höherer Spezifität, Bindungsaffinität, Stabilität und geringerer Immunogenität herstellen. Zusätzlich können verschiedene Antikörperformate wie Fab-Fragmente („*fragment antigen binding*“) oder Einzelkettenantikörper (scFv, „*single chain fragment variable*“) hergestellt und so die Tumorpenetration im Vergleich zu Vollängenantikörpern verbessert werden [10]. *In vitro*

Display Technologien wie Ribosom-, Yeast- und vor allem Phage Display können heutzutage verwendet werden, um Antikörper gegen praktisch jedes Antigen zu generieren [20].

1.3 Generierung spezifischer Antikörper mittels Phage Display

Bei der Phage Display Technologie werden Peptide oder Proteine auf der Oberfläche von Bakteriophagen exprimiert, wodurch es zur direkten Verknüpfung der genetischen Information, dem Genotyp, und den physikalischen Eigenschaften, dem Phänotyp, des Peptids/Proteins kommt [21]. Hierdurch können Protein-Protein Interaktionen untersucht oder mit Hilfe einer Erkennungsstruktur aus einer Vielzahl von Peptiden bzw. Proteinen ein Gewünschtes isoliert werden. Die genetische Information der zu präsentierenden Proteine wird hierfür an die Gene der Hüllproteine eines filamentösen Bakteriophagen fusioniert. Während der Replikation neuer Phagen werden diese Fusionsproteine dann exprimiert und beim Zusammenbau der Phagenpartikel eingebaut, wodurch die Proteine auf der Oberfläche dargestellt werden [21].

Erstmals wurde die Verbindung zwischen Phänotyp und Genotyp von George Smith im Jahr 1985 gezeigt [22], wodurch die Phage Display Technologie begründet wurde. Hierbei wurde ein Fragment des Restriktionsenzym *EcoRI* an das Kapsidprotein pIII eines filamentösen Bakteriophagen gekoppelt. Das Fragment konnte auf der Oberfläche der Phagen mit einem *EcoRI* spezifischen Antikörper nachgewiesen und aus einem Gemisch mit Überschuss an Wildtypphagen isoliert werden. 1989 konnten Richard Lerner und Kollegen aus einer Bibliothek zufällig kombinierter V_H und V_L Ketten mit Hilfe der Phage Display Technologie Fab-Fragmente isolieren und zeigten auf diese Weise eine Alternative zur Hybridomatechnologie für die Herstellung von monoklonalen Antikörpern [23]. Durch die Kopplung von Phänotyp und Genotyp ist im Vergleich zur Hybridomatechnik die DNA-Sequenz der isolierten Antikörper bekannt.

1.3.1 Aufbau von Bakteriophagen

Bei filamentösen Bakteriophagen handelt es sich um Viren, die Bakterien infizieren. Die für das Phage Display am häufigsten verwendeten Phagen gehören zur Ff Klasse (f1, fd und M13) [21]. Ihr Durchmesser beträgt 6,5 nm bei einer Länge von 940 nm. Sie besitzen ein zirkuläres (+) ssDNA Genom in einem langen Proteinzylinder, das 6.400 Nukleotide groß ist und für elf Proteine kodiert. Die Proteine pI, pIV und pXI sind für den Zusammenbau neuer Phagenpartikel im infizierten Bakterium zuständig, während pII, pV und pX für die Replikation des Genoms verantwortlich sind. Die Hülle des Phagen wird von den Proteinen pIII, pVI, pVII, pVIII und pIX gebildet, wobei pVIII mit 2.700 Kopien den größten Anteil der Hülle ausmacht und daher als Hauptkapsidprotein bezeichnet wird.

Am distalen Ende befinden sich je fünf Mal die Proteine pVII und pIX, am proximalen Ende je fünf Mal pIII und pVI, sie werden daher als Nebenkapsidproteine bezeichnet (s. Abb. 2). Die Infektion erfolgt über Bindung von pIII an den F-Pilus von Bakterien, wodurch sich der F-Pilus zusammenzieht und so den Phagen zum Periplasma bringt [24]. Außerdem verhindert pIII eine weitere Infektion des Bakteriums, so dass es nicht zu einer Superinfektion kommen kann [25]. Das Hauptkapsidprotein pVIII verbindet sich anschließend mit der Zytoplasmamembran des Bakteriums, wodurch das Genom ins Zytoplasma gelangen kann. Hier findet die Synthese des komplementären (-) Stranges und die Transkription und Translation durch bakterielle Enzyme statt. Die Replikation des Phagengenoms erfolgt über einen „rolling-circle“ Mechanismus. Alle neu synthetisierten Kapsidproteine werden zunächst in die bakterielle Zytoplasmamembran eingefügt, bis sie für den Zusammenbau der neuen Phagenpartikel um das Genom zusammengesetzt werden. Der Zusammenbau erfolgt hierbei in drei Schritten: Der Initiation, der Elongation und der Termination, wobei pIII den Zusammenbau abschließt und die Freisetzung der Phagenpartikel ermöglicht [21]. Bei der Freisetzung wird das Bakterium nicht zerstört, es handelt sich also um nicht-lytische Viren.

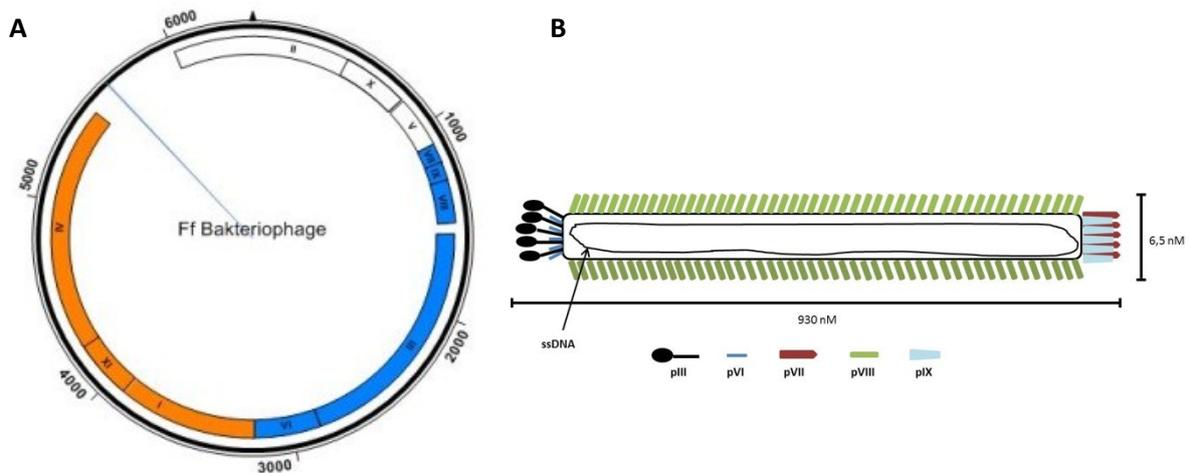


Abb. 2: Genom eines Ff Bakteriophagen und Aufbau des Phagenpartikels

A: Das Genom der Ff Bakteriophagen ist 6.400 Nukleotide groß und kodiert für elf Proteine wobei pX und pXI Produkte eines internen Translationsstarts in den Genen II bzw. I sind. Die Funktionen der Genprodukte lassen sich in drei Gruppen unterteilen: DNA Replikation (pII, pV, pX), Zusammenbau (pI, pIV, pXI) und Hüllproteine (pIII, pVI, pVII, pVIII, pIX). **B:** Die Hülle des Bakteriophagen besteht aus 2.700 Kopien des Hauptkapsidproteins pVIII. An den Enden befinden sich die Nebenkapsidproteine pIII, pVI, pVII und pIX, jeweils fünf Mal. Das ssDNA Genom wird von der Hülle umschlossen.

1.3.2 Die Phage Display Technologie

Die Darstellung der Peptide/Proteine erfolgt durch Fusion der DNA-Sequenz an die Gensequenz eines der Hüllproteine, in den meisten Fällen an pIII oder seltener an pVIII, Fusionen an pVI [26], pVII und

pIX [27] sind jedoch auch beschrieben. Auf Grund der hohen Kopienzahl von pVIII auf der Phagenoberfläche, kommt es bei Fusion an pVIII zu einer polyvalenten Darstellung des Peptids, weshalb sich diese Art der Darstellung besonders zur Untersuchung schwacher Peptidinteraktionen eignet [21]. Ein Nachteil besteht jedoch darin, dass die exprimierten Peptide nur sechs bis maximal zwölf Aminosäuren lang sein dürfen, da sonst der Zusammenbau der Phagenpartikel aus sterischen Gründen nicht möglich ist. Sollen längere Peptide auf der Oberfläche präsentiert werden, müssen mindestens 80 % von pVIII ohne Peptid sein, um einen Zusammenbau der Phagenpartikel zu ermöglichen. Dies ist ein Grund weshalb für längere Peptide und Proteine meist pIII Fusionen verwendet werden, da hier auch mit längeren Peptiden/Proteinen ein korrekter Zusammenbau der Phagen möglich ist. Ein Nachteil ist jedoch, dass die Infektiosität der Phagen - vor allem bei großen Proteinen - durch die Fusion an pIII reduziert wird, da die Infektion der Bakterien über pIII stattfindet [22].

Beim Phage Display werden zwei Arten von Vektoren unterschieden: Wildtyp Phagenvektoren und Phagemids. Bei Wildtyp Phagenvektoren handelt es sich um das normale Phagen genom mit Peptid bzw. Protein fusioniert an das gewünschte Hüllprotein. Hieraus resultieren Phagen, die an jedem entsprechendem Hüllprotein das fusionierte Peptid/Protein darstellen. Längere Peptide über 30 Aminosäuren sind jedoch problematisch, weshalb Wildtyp Phagenvektoren fast ausschließlich bei Peptidbibliotheken eingesetzt werden [21]. Dahingegen enthalten Phagemids einen viralen und einen bakteriellen Replikationsstartpunkt (für die virale Strangsynthese, sowie die bakterielle Replikation des Phagemids), ein „Packaging Signal“ (für den Einbau des Phagemids in neu synthetisierte Phagenpartikel), eine Antibiotikaresistenz (als Selektionsmarker) und das Peptid-Phagenprotein-Fusionsgen, meist unter einem spezifischen Promotor. Das Phagemid kann in Bakterien aufbewahrt und repliziert werden. Weitere Vorteile eines Phagemids sind die höhere Transformationseffizienz und Stabilität im Vergleich zu Phagenvektoren [28]. Da es jedoch nur ein Phagen genom enthält, wird für die Synthese neuer Phagenpartikel die Infektion eines Helferphagen benötigt. Dieser Helferphage liefert dann die restlichen Phagen gene für die Replikation und den Zusammenbau, so dass es zur Darstellung des Proteins auf neu synthetisierten Phagen kommen kann. Die Helferphagen besitzen einen Defekt im Replikationsstartpunkt oder im „*Packaging Signal*“, weshalb bevorzugt das Phagemid in die neu synthetisierten Phagenpartikel eingebaut wird [21]. Auf Grund der beschriebenen Vorteile und der Länge der Antikörper wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Phagemid-basierte Antikörperbibliothek verwendet.

Am häufigsten eingesetzt wird die Phage Display Technologie zur Isolierung spezifischer Antikörper gegen ein beliebiges Antigen aus einer Vielzahl von verschiedenen Antikörpern. Bei den präsentierten Antikörpern handelt es sich entweder um Fab-Fragmente oder Einzelkettenantikörper

(scFv's). Fab-Fragmente bestehen aus dem variablen Teil der leichten und schweren Kette, sowie dem konstanten Teil der leichten und dem CH-1 Teil der schweren Kette. ScFv's bestehen nur aus den beiden variablen Domänen der schweren und leichten Kette, die über einen flexiblen Peptidlinker verbunden sind (s. Abb. 3). Dieses Antikörperformat wurde 1988 von Bird und Kollegen entwickelt [29]. Die Diversität einer Antikörperbibliothek liegt in der Regel zwischen 10^9 und 10^{11} [30], wobei der Anteil an Plasmiden mit Antikörpergenen im korrekten Leseraster entscheidend für die Qualität einer Bibliothek ist. Man spricht daher von der funktionalen Größe einer Antikörperbibliothek. Es konnte gezeigt werden, dass die Bibliotheksgröße einen direkten Einfluss auf die Affinität der generierten Antikörper hat [31, 32]. Hierbei gilt: je größer die Bibliothek, desto höher die Wahrscheinlichkeit hoch affine Antikörper zu selektionieren. Bei den Antikörperbibliotheken unterscheidet man neben dem Antikörperformat zusätzlich zwischen immunisierten, naiven und synthetischen bzw. semisynthetischen Bibliotheken. Die genetische Information für die Antikörper stammt aus B-Zell RNA, die zuvor aus Blut, Knochenmark, Milz, Lymphknoten, Mandeln oder Thymus isoliert wurde. Der Unterschied zwischen einer naiven und einer immunisierten Bibliothek besteht darin, dass die RNA für immunisierte Bibliotheken aus einem Spender stammt, der zuvor in Kontakt mit dem Antigen kam, gegen welches man einen Antikörper selektionieren möchte [33]. Bei synthetischen Antikörperbibliotheken erreicht man die Diversität durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und randomisierte Oligonukleotidprimer oder TRIM-Technology (Trinukleotid Phosphoramidit) [34-38].

Die Weiterentwicklung der Phage Display Technologie ermöglicht die Herstellung immer größerer und an die jeweiligen Selektionsziele angepasster Antikörperbibliotheken, so dass theoretisch spezifische Antikörper gegen jedes Antigen generiert werden können [30]. Bei den Antigenen kann es sich um Oberflächenmoleküle, Rezeptoren, Hormone, Viren, aber auch Toxine und nicht-immunogene Substanzen handeln. Phage Display ist daher die erfolgreichste und meist angewandte *in vitro* Methode zur Generierung von Antikörpern [10, 39, 40]. Weitere Einsatzmöglichkeiten findet die Phage Display Technologie bei der Entdeckung von Liganden zu einem Rezeptor [41], der Identifizierung des spezifischen Epitops eines monoklonalen Antikörpers [42] oder bei der Selektion von bereits bekannten, aber synthetisch modifizierten Antikörpern [43]. Des Weiteren wird die Technik bei der Genom- und Proteomuntersuchung angewandt [8, 44].

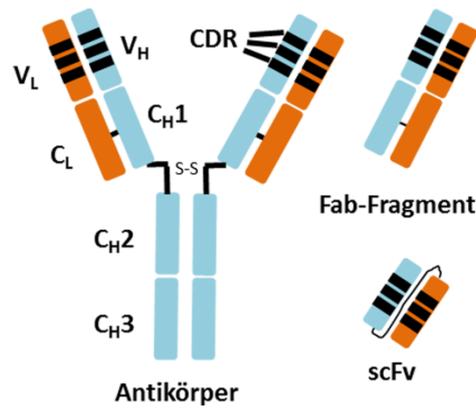


Abb. 3: Schematische Darstellung verschiedener Antikörperformate

Darstellung eines IgG Volllängenantikörpers und davon abgeleiteter Fragmente. Ein Fab-Fragment besteht aus dem variablen und konstanten Teil der leichten Kette, sowie dem variablen und dem CH1-Teil der schweren Kette. Mit einem Molekulargewicht von 50 kDa entspricht es einem Drittel der Größe eines kompletten IgG's. Die beiden Ketten sind über eine Disulfidbrücke verbunden. Im Vergleich dazu besteht ein Einzelkettenantikörper (scFv) nur aus den variablen Domänen der leichten und schweren Kette, die über einen Peptidlinker verbunden sind. Das Molekulargewicht eines scFv beträgt 25 kDa.

V_L: variabler Teil der leichten Kette; V_H: variabler Teil der schweren Kette; C_L: konstanter Teil der leichten Kette; C_H: konstanter Teil der schweren Kette; CDR: Complementarity Determining Region; S-S: Disulfidbrücke

1.3.3 Die Tomlinson Antikörperbibliotheken I und J

In dieser Arbeit wurden die humanen, semisynthetischen scFv Antikörperbibliotheken I und J von Tomlinson verwendet [45]. Beide Bibliotheken basieren auf einem Konstrukt aus den Gensegmenten V3-23/DP-47 und J_H4b für die schwere Kette und O12/O2/DPK9 und J_κ1 für die leichte Kette [46]. Diese kommen am häufigsten im menschlichen Antikörperrepertoire vor, sind thermodynamisch stabil und zeichnen sich zusätzlich durch ihre gute Expression in Prokaryoten aus, weshalb viele isolierte Antikörper aus diesen Keimbahngen stammen [34, 47-49]. Die Diversität der Bibliotheken wurde durch randomisierte Mutagenese der CDR's mittels der degenerierten Nukleotide DVT (D = Adenin, Guanin oder Thymin; V = Adenin, Cytosin oder Guanin; T = Thymin) bei Bibliothek I bzw. NNK (N = Adenin, Cytosin, Guanin oder Thymin; K = Guanin oder Thymin) bei Bibliothek J erzeugt, wodurch die Bibliothek I eine Größe von $1,47 \times 10^8$ und die Bibliothek J von $1,37 \times 10^8$ besitzen. Auf Grund der NNK Triplets kommt es jedoch bei Bibliothek J statistisch gesehen in 3 % der scFv's zu Stopcodons [50]. Die Mutagenese erfolgte an 18 verschiedenen Aminosäurepositionen der CDR2 und CDR3 (H50, H52, H52a, H53, H55, H56, H58, H95, H96, H97, H98, L50, L53, L91, L92, L93, L94 und L96), die im humanen Antikörperrepertoire hoch divers und an der Antigenbindung beteiligt sind [51]. V_H und V_L sind über einen flexiblen, 15 Aminosäure-langen Glycin-Serin-Linker ((Gly₄-Ser)₃) miteinander verbunden und N-terminal an das Gen III fusioniert. Dieses Fusionsprotein ist auf dem pIT2 Phagemid-Vektor kodiert (s. Abb. 5; Material und Methoden). Die bakterielle Pektatlyase B

(pelB) Leadersequenz am 5'-Ende des Fusionsproteins sorgt für den Transport ins Periplasma, wo durch die oxidierenden Bedingungen eine korrekte Faltung der Fusionsproteine ermöglicht wird. Die Expression wird über einen Lac-Promotor reguliert. Zur Detektion und Aufreinigung befinden sich zwischen dem scFv und dem Phagenprotein ein Hexahistidin- und ein Myc (N-EQKLISEEDL-C)-Tag [45].

1.3.4 Der Selektionsprozess

Den eigentlichen Selektionsprozess zur Generierung von spezifischen Antikörpern aus einer Antikörperbibliothek bezeichnet man als „*Panning*“. Hierdurch wird die natürliche Antikörperselektion der B-Zellen im Organismus imitiert. Der Panningprozess wird in Abb. 4 schematisch dargestellt. Zunächst werden Bakterien, die das Phagemid mit dem Antikörper-pIII-Fusionsgen enthalten, mit Helferphagen infiziert (Abb. 4 A). Die synthetisierten Phagenpartikel exprimieren dann auf ihrer Oberfläche die verschiedenen Antikörper der Bibliothek und können von den Bakterien durch Zentrifugation getrennt werden (Abb. 4 B). Durch die Wahl des Helferphagen lässt sich die Anzahl an exprimierten Antikörpern auf der Oberfläche der Phagen steuern und ermöglicht somit eine monovalente oder polyvalente Darstellung der Antikörper [52, 53]. Da die Helferphagen das Gen III zur Herstellung von pIII ohne Antikörper tragen und dieses parallel exprimiert wird, werden nur auf 1 - 10 % aller Phagenpartikel eine Kopie des Antikörpers dargestellt, auf weniger als 1 % mehrere Kopien [54]. Der Hauptteil der antikörpertragenden Phagen ist daher monovalent, während ca. 90 % der Phagen gar keinen Antikörper präsentieren. Mit Hilfe eines Hyperphagen, bei dem das Gen III defekt ist und daher kein Wildtyp pIII exprimiert werden kann, entstehen nur Phagenpartikel, die an allen fünf pIII Hüllproteinen einen Antikörper darstellen und daher polyvalent sind. Ein Nachteil der Hyperphagen ist jedoch, dass ihre Infektiosität geringer ist als bei monovalenten Helferphagen, da die Infektion über pIII stattfindet [21]. Durch die polyvalente Darstellung der Antikörper erfolgt die Bindung an das entsprechende Antigen nicht nur über die Affinität des Antikörpers, sondern zusätzlich auch über die Avidität der fünf Antikörper. Dies kann erwünscht sein, um aus einer großen Anzahl von Antikörpern zunächst möglichst viele, diverse Binder zu selektionieren [30]. Um hoch affine Antikörper zu selektionieren, kann es jedoch auch von Vorteil sein, diese monovalent zu präsentieren, damit die Bindung zum Antigen rein von der Affinität des Antikörpers abhängt.

Nach Herstellung der antikörpertragenden Phagen, dem sogenannten „*Phage Rescue*“, wird die Phagensuspension zu einem Zielantigen gegeben (Abb. 4 C). Die unspezifisch gebundenen Phagen werden durch mehrfaches Waschen vom Antigen entfernt (Abb. 4 D) und im Anschluss die spezifisch gebundenen Phagen eluiert (Abb. 4 E). Die Elution kann hierbei pH-abhängig, enzymatisch oder

kompetitiv erfolgen [20]. Die eluierten Phagen können anschließend erneut Bakterien infizieren, wodurch das Phagemid gesichert wird (Abb. 4 F). Für die Anreicherung spezifischer, hoch affiner Antikörper wird dieser Panning-Prozess drei bis fünf Mal wiederholt. In der Regel wird dabei die Antigenkonzentration von Runde zu Runde reduziert, während man die Waschstringenz erhöht.

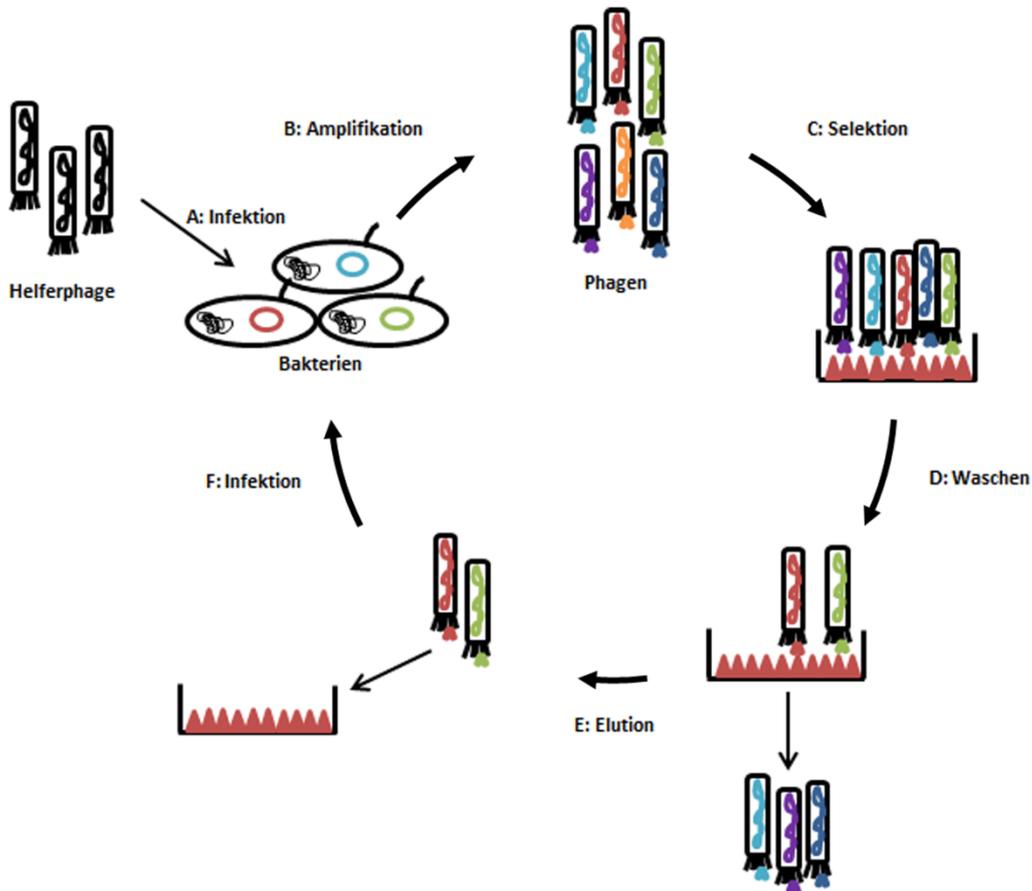


Abb. 4: Schematische Darstellung einer Standard-Antikörperselektion mittels Phage Display

Mit Hilfe der Phage Display Technologie können aus einem Pool von Antikörpern spezifische Antikörper selektioniert werden. Die genetische Information der Antikörper befindet sich hierbei auf einem Phagemid in Bakterien. Die Expression der Antikörper auf der Phagenoberfläche erfolgt durch Infektion der Bakterien mit Helferphagen (A). Die amplifizierten Phagen (B) werden für die Selektion auf das Zielantigen gegeben (C). Nach Entfernung unspezifisch gebundener Phagen durch mehrmaliges Waschen (D), können die verbliebenen Phagen eluiert werden (E) und erneut Bakterien infizieren (F). Für die Selektion spezifischer Antikörper wird dieser Prozess drei bis fünf Mal wiederholt.

1.4 On Slide Selektion

Beim Standardselektionsverfahren wird ein definiertes Antigen in Form eines rekombinanten Proteins als Zielstruktur verwendet. Die Herstellung rekombinanter Proteine kann jedoch schwierig sein, da diese in Prokaryoten oftmals nicht korrekt gefaltet werden und die Ausbeute meist sehr

gering ist [55]. Die Proteine sind teilweise instabil und zeigen keine biologische Aktivität, außerdem fehlen posttranslationale Modifikationen. Im Vergleich dazu ist die eukaryotische Herstellung wesentlich zeitaufwendiger und teuer. Zusätzlich muss die Expression in der Regel an das entsprechende Antigen angepasst und dieses anschließend aufgereinigt werden, wobei das Antigen ebenfalls seine Konformation verändern kann. Hinzu kommt, dass die Antigene nur gefroren bei -20 oder sogar -80 °C stabil gelagert werden können. Bei der Standardselektion wird das Antigen auf einer speziell beschichteten Plastikoberfläche immobilisiert; ein Vorgang, den man als „Coaten“ bezeichnet. Hierbei kann das Antigen allerdings denaturiert werden und entspricht dann nicht mehr seiner natürlichen Form [56]. Da die Antigenerkennung durch die Bindedomäne eines Antikörpers jedoch konformationsabhängig ist, können daher Antikörper selektioniert werden, die das Antigen nur in der denaturierten Form erkennen und damit nicht mehr in seiner nativen Struktur auf der Oberfläche von Zellen. Um dies zu verhindern können biotinylierte Antigene, die für die Selektion nicht auf einer Oberfläche immobilisiert werden müssen, oder transfizierte Zellen und Tumorzelllinien verwendet werden. Hierbei finden die Selektionen in Lösung statt, damit es nicht zur Denaturierung der Zielstrukturen auf der Plastikoberfläche kommt. Bei Zelllinien besteht jedoch die Gefahr, dass sie durch Entfernung aus ihrem Tumorenvironment, der Immortalisierung und Kultivierung genetische und epigenetische Veränderungen durchlaufen, wodurch es zu einer aberranten Expression oder sogar dem Verlust von Oberflächenantigenen kommen kann. Die Tumorzelllinien entsprechen dadurch nicht mehr dem ursprünglichen Tumor [55, 57]. Dies kann dazu führen, dass die *in vitro* selektionierten Antikörper die Krebszellen *in vivo* nicht erkennen.

Auf Grund dieser Nachteile bei der Selektion auf rekombinanten Proteinen oder Zelllinien wurden Selektionen auf *ex vivo* Material entwickelt [57-63]. Ein großer Vorteil bei der Verwendung von Gewebe besteht darin, dass die Tumorzellen in ihrer natürlichen Umgebung vorliegen und ihre klinische Charakteristik behalten. Zusätzlich besteht bei der Verwendung von Patientenmaterial eine höhere Wahrscheinlichkeit Antikörper gegen klinisch relevante Epitope zu generieren [57]. Bei den beschriebenen Methoden werden in der Regel Gefrierschnitte und zusätzlich die Laser Capture Mikrodisektion (LCM) eingesetzt, um die Tumorzellen vom restlichen Gewebe trennen zu können. Mit Hilfe eines Laserstrahls werden hierbei die Zellen unter einem Mikroskop markiert und in ein Gefäß oder auf eine Membran katapultiert. Findet die Selektion der Antikörper jedoch direkt auf dem Gewebe statt, kommt es während der Laserbestrahlung zum Viabilitätsverlust der Phagen, wodurch deren Infektiosität stark abnimmt und damit einhergehend auch der Selektionserfolg [62]. Um das Problem der absterbenden Phagen zu umgehen, wurden die Antikörpergene nach der LCM mittels PCR amplifiziert und in Vektoren kloniert [57]. Dieser Vorgang ist jedoch sehr aufwendig. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, die Tumorzellen erst mittels LCM aus dem Gewebe zu isolieren und anschließend die Selektion auf den Zellen durchzuführen [61, 62], wobei jedoch ebenfalls ein

Lasermikroskop benötigt wird. Sørensen und Kollegen modifizierten die *ex vivo* Selektion indem sie die Selektion direkt auf Objektträgern durchführten, die gebundenen Phagen auf den Tumorzellen mit Goldplättchen abdeckten und anschließend die Objektträger mit UV-Licht bestrahlten. Hierdurch sollen die nicht tumorassoziierten Phagen absterben und somit nach Elution keine Bakterien infizieren können [60, 64]. Die Selektion erfolgte hierbei jedoch nicht auf Patientenmaterial, sondern auf einer chronisch myeloischen Leukämie (CML) abgeleiteten Zelllinie, die unter Lymphozyten gemischt wurde. Jarutat und Kollegen führten eine Selektion auf Formalin-fixiertem, in Paraffin eingebettetem (FFPE) Schnitten in einem Gefäß durch, weshalb für das Wechseln der Flüssigkeiten ein Zentrifugationsschritt notwendig war [63]. Bisher ist noch keine Selektion direkt auf FFPE-Patientenmaterial, welches auf Glasobjektträgern immobilisiert wurde, ohne die Verwendung von LCM beschrieben.

1.5 Immunokonjugate

Zur Steigerung der therapeutischen Wirksamkeit von monoklonalen Antikörpern wurden zytotoxische Agenzien an die Antikörper gekoppelt [65]. Diese Antikörper bezeichnet man als Immunokonjugate. Bei den verwendeten zytotoxischen Agenzien kann es sich um Radioisotope, niedermolekulare Verbindungen („*small molecules*“) oder Proteine handeln. Der Antikörper dient hierbei als Transporter, der den Wirkstoff zielgerichtet zu den malignen Zellen bringt. Durch diesen zielgerichteten Transport kommt es zu weniger Nebenwirkungen im Vergleich zu einer systemischen Gabe des Wirkstoffs. Auf Grund der guten Ergebnisse von Immunokonjugaten bei hämatologischen und epithelialen Tumoren stieg das Interesse an Immunokonjugat-basierten Therapien in den letzten Jahren an [66]. Entscheidend für die Wirksamkeit eines Immunokonjugats mit niedermolekularer Verbindung oder mit einem Protein ist dessen schnelle Internalisierung, welche über rezeptorgesteuerte Endozytose erfolgt. Nach Aufnahme gelangt das Immunokonjugat ins Zytosol, wo der Wirkstoff freigesetzt wird und einen zytotoxischen Effekt auslösen kann [67]. Immunokonjugate mit Radioisotopen müssen auf Grund der radioaktiven Strahlung nicht von der Zelle internalisiert werden.

1.5.1 Radioimmunokonjugate

Wird an den Antikörper als Wirkstoff ein Radioisotop, auch als Radionuklid bezeichnet, gekoppelt, spricht man von einem Radioimmunokonjugat. Die Kopplung erfolgt hierbei entweder kovalent direkt an den Antikörper oder über einen Linker, an den eine chelatbildende Verbindung angelagert ist. Dieser sogenannte Chelator bindet dann das Radionuklid [68]. Bei den ersten

Radioimmunokonjugaten wurden β -Strahlen emittierende Isotope eingesetzt, seit einigen Jahren kommen aber auch vermehrt α -Strahlen emittierende Nuklide zum Einsatz. Des Weiteren werden in einigen Fällen Auger-Elektronen emittierende Isotope verwendet [69]. β -Strahler geben nur eine schwach ionisierende Strahlung ab, jedoch mit einer Reichweite im Gewebe von einigen Millimetern. Hierdurch werden auch umliegende Zellen bei der Therapie erfasst. Dieser so genannte Crossfire-Effekt kann bei der Radioimmunotherapie durchaus erwünscht sein, um umliegendes malignes Gewebe zu schädigen [70]. Besonders bei soliden Tumoren mit heterogener Zellpopulation können auf diese Weise auch Tumorzellen zerstört werden, die das Zielantigen zum Radioimmunokonjugat nicht auf ihrer Oberfläche tragen. Jedoch kann es hierdurch auch immer zu einer Schädigung von angrenzendem, gesundem Gewebe kommen. α -Strahler geben im Gegensatz dazu eine energiereichere ionisierende Strahlung mit geringerer Reichweite ab. Durch die Verwendung von α -Strahlern kann die Strahlung örtlich begrenzt eingesetzt und somit Schäden an umliegendem Gewebe verhindert werden. Durch die hohe Energie kommt es zu DNA-Doppelstrangbrüchen in der Zielzelle und somit zum Absterben [68]. Bei Auger-Elektronen emittierenden Isotopen ist die Strahlungsenergie niedrig und die Reichweite sogar noch geringer, weshalb diese nah an die DNA gelangen müssen und sich daher für den Einsatz bei internalisierenden Antikörpern eignen [70].

Bisher wurden mit Ibritumomab Tiuxetan (Zevalin) und Tositumomab (Bexxar) zwei Radioimmunokonjugate für die Therapie zugelassen. Bei Ibritumomab Tiuxetan handelt es sich um einen Maus IgG1 Antikörper gegen CD20, an den über den Linker-Chelator-Komplex Tiuxetan ein Radionuklid gekoppelt wurde. Für bildgebende Verfahren wurde zunächst Indium-111 angelagert und im Anschluss für den therapeutischen Einsatz Yttrium-90. Die Zulassung erfolgte 2004 (US 2002) für die Behandlung des Non-Hodgkins Lymphoms [68]. Tositumomab besteht aus einem IgG2a anti-CD20 Antikörper, an den kovalent Iod-131 gekoppelt ist. Die Zulassung wurde in den USA 2003 ebenfalls für die Therapie des Non-Hodgkins Lymphoms erteilt, jedoch wurde das Produkt auf Grund von geringer Verwendung im Februar 2014 freiwillig von seinem Hersteller GlaxoSmithKline zurückgenommen [71]. Ein Grund für die geringe Verwendung könnte darin liegen, dass bisher kein Vorteil von Tositumomab gegenüber Rituximab gezeigt werden konnte und es durch den Einsatz von radioaktiven Stoffen zu einem Mehraufwand, wie dem Schutz vor Strahlung und der Entsorgung des entstehenden radioaktiven Abfalls, kommt [70].

1.5.2 Antikörper-Wirkstoff-Konjugate

Als niedermolekulare Verbindungen bei Immunokonjugaten werden hoch potente zytotoxische Agenzien verwendet, die ohne zielgerichteten Transporter zu toxisch für einen therapeutischen Einsatz wären [65]. Diese Konjugate bezeichnet man als Antikörper-Wirkstoff-Konjugate („*antibody*

drug conjugate“, ADC). Am häufigsten werden Auristatin, Maytansinoide, Calicheamicin und Duocarmycin-Analoga eingesetzt. Neuere vielversprechende Agenzien wie Pyrrolobenzodiazepin und Amanitin befinden sich derzeit in präklinischen Untersuchungen [66]. Auristatin und Maytansinoide verhindern die Polymerisation von Tubulin, während Calicheamicin, Duocarmycin und Pyrrolobenzodiazepin durch Bindung in der kleinen Furche der DNA zu DNA-Doppelstrangbrüchen führen. Die zytotoxische Wirkung von Amanitin beruht auf der Inhibierung der RNA-Polymerase II [66]. Ein wichtiger Faktor für die Wirksamkeit der ADC ist die Wahl des Linkers, der die niedermolekularen Verbindungen mit dem Antikörper verbindet. Dieser muss während die ADC im Körper zirkulieren stabil sein, aber labil genug, um den Wirkstoff in der Zielzelle freizusetzen. Bei den Linkern unterscheidet man zwischen hydrolytisch bzw. proteolytisch verdaubaren Linkern, Disulfidbrücken-basierten, die den Wirkstoff durch die reduzierenden Bedingungen im Zytoplasma abgeben, und Hydrazon-basierten Linkern, bei denen der Wirkstoff durch den sauren pH-Wert im Endosom oder Lysosom freigesetzt wird [67]. Außerdem beeinflusst der Linker die Position und Anzahl der Bindungsstellen am Antikörper, wodurch das Wirkstoff-Antikörper-Verhältnis bestimmt wird. Das ideale Verhältnis beträgt drei bis vier Moleküle pro Antikörper; bei zu wenigen verringert sich die Toxizität, während es bei zu vielen Molekülen häufig zu Aggregation, verkürzter Halbwertszeit, schlechterer Verträglichkeit und verringerter Antigenbindung kommt [72]. Des Weiteren nimmt der Linker Einfluss auf die Polarität und damit die Löslichkeit des ADC und die Pharmakokinetik. Bis heute wurden 80 ADC mit niedermolekularen Verbindungen entwickelt von denen sich 30 in klinischen Studien befinden [67]. Die ADC zeigen in klinischen Studien bessere Ansprechraten als monoklonale Antikörper gegen das gleiche Epitop [65].

Das erste ADC Gemtuzumab Ozogamicin (Mylotarg) wurde in den USA im Jahr 2000 für die Behandlung von akuter myeloischer Leukämie (AML) zugelassen, in Europa wurde die Zulassung 2008 jedoch auf Grund einer negativen Nutzen-Risiko-Bewertung abgelehnt [73]. Es besteht aus einem humanisierten IgG4 Antikörper gegen CD33 und einem Calicheamicin Derivat. Nach schlechten Ergebnissen einer randomisierten Phase III Studie wurde das Konjugat 2010 freiwillig von seinem Hersteller Pfizer vom Markt zurückgenommen. Neuere Phase III Studien zeigten allerdings gute Ergebnisse und einen Benefit des Produkts bei AML Patienten mit geringem oder intermediärem Risiko [65]. Aktuell sind zwei ADC für den therapeutischen Einsatz zugelassen: Brentuximab Vedotin (Adcetris) und Trastuzumab Emtansin (Kadcyla). Bei Brentuximab Vedotin handelt es sich um den chimären Antikörper cAC10 gegen CD30 und Monomethylaurisatin E (MMAE), welche über einen Protease-sensitiven Dipetid-Linker verbunden sind. Seit 2012 (US 2011) ist Brentuximab Vedotin beim Hodgkin Lymphom und anaplastischen großzelligen Lymphom (ALCL) zugelassen. Eine weitere Zulassung für das kutanen T-Zell Lymphom (CTCL) wird angestrebt [65]. Trastuzumab Emtansin besteht aus dem monoklonalen Antikörper Trastuzumab gegen den HER2-Rezeptor, an den das

Maytansinoid DM1 über einen Disulfid-Linker gebunden ist. Zugelassen ist dieses ADC seit 2013 für die Therapie des HER2-positiven, metastasierten Mammakarzinoms [65]. Ein weiteres ADC Inotuzumab Ozogamicin (CMC-544), bestehend aus einem humanisierten IgG4 Antikörper und einem Calicheamicin Derivat, gegen CD22 beim Non-Hodgkins Lymphom und akuter lymphatischer Leukämie (ALL) wird aktuell in Phase III Studien untersucht.

1.5.3 Immuntoxine

Als Immuntoxine (IT's) werden Verbindungen zwischen Antikörpern und zytotoxischen Proteinen bezeichnet. Bei den am häufigsten eingesetzten Proteinen handelt es sich um die bakteriellen Toxine *Diphtheria* Toxin (DT) und *Pseudomonas* Exotoxin (PE) und um das pflanzliche Toxin Ricin [74]. Alle Toxine enthalten eine zellbindende Domäne, über die der Kontakt zur Zelle hergestellt wird, eine katalytische Domäne, welche im Zytosol der Zelle einen zytopathischen Effekt auslöst, und einer Translokationsdomäne, die den Transport der katalytischen Domäne ins Zytosol ermöglicht. Ohne Kopplung an einen spezifischen Antikörper kann die Zellbindung jedoch nicht zielgerichtet gesteuert werden. Die Wirkungsweise von DT und PE beruht auf der ADP-Ribosylierung des Elongationsfaktors 2, wodurch es zur letalen Blockierung der Proteinbiosynthese kommt. Bei Ricin handelt es sich um eine N-Glycosidase, die ein Adenin innerhalb der 28S rRNA depuriniert. Hierdurch kommt es zur Inaktivierung der 60S Ribosomuntereinheit und somit ebenfalls zur Blockierung der Proteinsynthese [75]. Die zytotoxische Wirkung kann jedoch nur bei korrekter Translokation der katalytischen Domäne ins Zytosol erfolgen. Nach Aufnahme von DT im Endosom führt das saure Milieu zur Konformationsänderung des Toxins. Es kommt zur Insertion in die endosomale Membran, wodurch die katalytische Domäne ins Zytosol gelangt. PE und Ricin verbinden sich zunächst mit dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) bevor es zur Translokation kommt [74].

Bei den ersten IT's wurden die Toxine chemisch an den Antikörper konjugiert. Auf Grund der vorzeitigen Trennung des Toxins vom Antikörper und dessen zellbindender Domäne kam es jedoch häufig zu ernststen Nebenwirkungen, besonders in Leber, Niere und vaskulärem Endothelium, infolge dessen das Vaskular-Leak-Syndrom und das hämolytisch-urämischen Syndrom auftraten [74]. Neue Generationen von IT's werden als rekombinante Proteine hergestellt, bei denen die zellbindende Domäne der Toxine entfernt wurde und dadurch nur eine Bindung durch die Bindedomäne des Antikörpers ermöglicht wird [76]. Bei den Antikörpern handelt es sich um scFv's oder dsFv („*disulfide-stabilized fragment variable*“) Antikörper, die auf Grund ihrer geringen Größe eine bessere Tumorpenetration ermöglichen. Weitere Vorteile von rekombinanten Proteinen bestehen in deren flexiblem Design und homogener Produktion [74]. Problematisch bei der Verwendung von bakteriellen oder pflanzlichen Toxinen ist jedoch deren hohe Immunogenität, wodurch es zur Bildung

von neutralisierenden Antikörpern im Organismus kommt. Zur Verringerung der Immunogenität können B- und T-Zell Epitope auf den Toxinen entfernt [77-79] oder zusätzlich Immunsuppressiva verabreicht werden [80]. Weiterhin kann die Immunogenität durch die Verwendung von humanen, proapoptischen Proteinen minimiert werden. Beispiele hierfür sind verschiedene Bcl-2 Familienmitglieder [81], Caspase 3 [82] & 6 [83], Granzyme B [84] & M [85], Endonuklease DNA Fragmentationsfaktor (DFF) [86], Apoptose-induzierender Faktor (AIF) [87], Fas Ligand (FASL) [88], RNAsen (z.B. Angiogenin) [89] oder DAPK2 [90].

Aktuell ist noch kein antikörperbasiertes IT für die Therapie zugelassen. Derzeit befinden sich allerdings 15 Immuntoxine mit vielversprechenden Ergebnissen in klinischen Studien [74].

1.6 Kleinzelliges Bronchialkarzinom (SCLC)

1.6.1 Epidemiologie und Ätiologie

Auf Grund der demographischen Entwicklung in Deutschland wird zwischen 2010 und 2030 ein Anstieg an Krebsneuerkrankungen um 20 % erwartet [91]. Bronchialkarzinome zählen hierbei zu den zweithäufigsten Tumorerkrankungen bei Männern (13,9 %) und zu den dritthäufigsten bei Frauen (7,6 %). Im Jahr 2010 lag die Inzidenz an malignen Lungenerkrankungen bei insgesamt 52.070 Menschen, im Jahr 2014 wird mit einem Anstieg auf 55.600 gerechnet. Weltweit sind Lungenkarzinome die häufigste tumorassoziierte Todesursache [92], wobei in Deutschland die Zahl der jährlichen Sterbefälle bei ca. 43.000 Menschen liegt. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt für Männer bei 15 % und für Frauen bei 20 %. Hauptrisikofaktor für die Entstehung von Bronchialkarzinomen ist Tabakrauch, wodurch ein 20-fach erhöhtes Erkrankungsrisiko im Vergleich zu Nichtrauchern besteht. In seltenen Fällen führen aber auch kanzerogene Stoffe, ionisierende Strahlung, Luftverschmutzung oder HPV- und EBV-Infektionen zu Bronchialkarzinomen [93].

Histopathologisch werden Bronchialkarzinome in kleinzellige (SCLC) und nicht-kleinzellige (NSCLC) Bronchialkarzinome unterteilt, wobei innerhalb der NSCLC noch weiter zwischen Adenokarzinom, Plattenepithelkarzinom und großzelligem Karzinom unterschieden wird. SCLC's haben im Gegensatz zu NSCLC's einen neuroendokrinen Ursprung und machen ca. 13 % aller Lungenkarzinome aus [94]. Sie wurden erstmals 1959 beschrieben und zeigen einen besonders aggressiven klinischen Verlauf [95]. In den meisten Fällen sind SCLC's zum Zeitpunkt der Diagnose schon metastasiert, wobei die Metastasierung vor allem hämatogen in Knochen und Gehirn auftritt [96]. Genetische Veränderungen bei Bronchialkarzinomen wurden in den letzten Jahren vor allem beim NSCLC gut untersucht, für SCLC besteht hier noch Handlungsbedarf [97]. Diese genetischen Veränderungen

können zu einer aberranten Expression von Oberflächenmolekülen oder Transkriptionsfaktoren führen, die dann als potenzielle Zielstrukturen für eine Therapie eingesetzt werden können.

1.6.2 Diagnose

Die Symptomatik des Bronchialkarzinoms ist unspezifisch, weshalb es meist sehr spät diagnostiziert wird. Es kann zu Husten, bluthaltigem Auswurf, Atemnot, Thorax- und Knochenschmerzen, Fieber, allgemeiner Abgeschlagenheit und starkem Gewichtsverlust kommen. Weitere Symptome können auf Grund von definierten Metastasierungsorten entstehen, wie beispielsweise Kopfschmerzen und Schwindel bei Hirnmetastasen [93]. Die Diagnose erfolgt zunächst mittels Röntgen, Computer- und Magnetresonanztomografie des Thorax, sowie Differentialblutbild und wird durch eine Bronchoskopie, transthorakale Nadelaspiration oder Feinnadelbiopsien der supraklavikulären Lymphknoten gesichert. Fernmetastasen lassen sich vor allem durch die Positronenemissionstomografie nachweisen. Ein flächendeckendes Screening durch Röntgenthoraxaufnahmen, Computertomografie oder zytologische Sputumsuntersuchung wird nicht empfohlen, da dessen Nutzen nicht belegt werden konnte [93].

1.6.3 Tumorklassifizierung

Die Tumorklassifizierung des SCLC erfolgt nach zwei Arten: der Veteran's Administration Lung Study Group (VALSG) und der Tumor-node-metastasis (TNM) Klassifikation. Bei der VALSG wird ein einseitiger Befall des Thorax mit teilweise lokaler Ausbreitung, ipsilateralem Lymphknotenbefall, jedoch ohne Fernmetastasen als Limited Disease (LD) bezeichnet; manchmal erfolgt bei auf die Lunge begrenztem Primärtumor und ohne mediastinalen Lymphknotenbefall eine zusätzliche Einteilung in Very Limited Disease (VLD). Wohingegen man beim Befall beider Thoraxhälften, Pleura- oder Perikardergüssen, kontralateralem und supraklavikulärem Lymphknotenbefall oder Fernmetastasen von Extensive Disease (ED) spricht [95]. VLD wird lediglich bei ca. 5 % der Patienten diagnostiziert, LD bei 15 – 25 %, während bei 70 % - 80 % bereits ein ED zugrunde liegt [93]. Die TNM-Klassifikation beschreibt den Grad der Tumorausbreitung und wird in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: TNM-Klassifikation beim kleinzelligen Bronchialkarzinom [93]

T (Tumor)	
T _x	Tumorzellen im bronchopulmonalen Sekret, ohne sichtbaren Tumor
T ₀	Kein primärer Tumor
T _{is}	Carzinoma <i>in situ</i>
T _{1a} : ≤ 2 cm T _{1b} : 2-3 cm	Tumor umgeben von Lungengewebe oder Pleura visceralis
T _{2a} : 3-5 cm T _{2b} : 5-7 cm	Infiltration des Hauptbronchus, der Pleura visceralis oder partielle Atelektase
T ₃ : > 7 cm	Direkte Invasion von Thoraxwand, Zwerchfell, Pleura mediastinalis, parietales Perikard, Atelektase oder Metastase im gleichen Lungenlappen
T ₄	Infiltration von Carina, Mediastinum, Herz, Trachea, Ösophagus, großen Gefäßen, N. laryngeus recurrens, Wirbelsäule oder Metastase in ipsilateralem Lungenlappen
N (Lymphknoten)	
N ₀	Keine Lymphknoten-Metastasen
N ₁	Metastasen in ipsilateralen peribronchialen und/oder ipsilateralen hilären Lymphknoten
N ₂	Metastasen in ipsilateralen mediastinalen und/oder subkarinalen Lymphknoten
N ₃	Metastasen in kontralateralen mediastinalen, kontralateralen hilären, ipsilateralen oder kontralateralen Skalenus oder supraclaviculären Lymphknoten
M (Fernmetastasen)	
M ₀	Keine Fernmetastasen
M _{1a}	Lungenmetastasen im kontralateralen Lungenlobus, Pleurakarzinose, maligner Pleura- oder Perikarderguss
M _{1b}	Fernmetastasen in extrapulmonalen Organen

Nach Vorgaben der UICC („*Union Internationale contre le Cancer*“) wird mit Hilfe der TNM-Klassifikation eine Einteilung in fünf verschiedene Tumorstadien vorgenommen, wonach eine Prognoseabschätzung und Therapieplanung erfolgt. Tabelle 4 zeigt die Stadieneinteilung des Lungenkarzinoms.

Tabelle 4: Stadieneinteilung des Lungenkarzinoms [93]

Stadium	TNM-Klassifizierung
Stadium 0	T_{is}, N_0, M_0
Stadium IA	T_{1a}, N_0, M_0 T_{1b}, N_0, M_0
Stadium IB	T_{2a}, N_0, M_0
Stadium IIA	$T_{1a} - T_{2a}, N_1, M_0$ T_{2b}, N_0, M_0
Stadium IIB	T_{2b}, N_1, M_0 T_3, N_0, M_0
Stadium IIIA	$T_{1a} - T_3, N_2, M_0$ $T_3 - T_4, N_1, M_0$ T_4, N_0, M_0
Stadium IIIB	T_4, N_2, M_0 jedes T, N_3, M_0
Stadium IV	jedes T, jedes N, M_{1a} jedes T, jedes N, M_{1b}

1.6.4 Therapie und Prognose

Die Therapie des kleinzelligen Bronchialkarzinoms erfolgt in Abhängigkeit des Tumorstadiums, wobei sich nach den Therapieleitlinien gerichtet wird [93]. Zentrale Therapiemaßnahme ist eine Kombinationschemotherapie, welche stadienabhängig durch weitere Maßnahmen ergänzt wird. Die Chemotherapie besteht aus einer Kombination von Cisplatin oder Carboplatin zusammen mit Etoposid; in einigen Fällen wird auch eine Kombination aus Cyclophosphamid, Doxorubicin und einem Vinkaalkaloid angewendet. Durch eine Kombination mit neueren Zytostatika der dritten Generation, wie Paclitaxel oder Irinotecan, konnte keine Verbesserung im Vergleich zur bestehenden Therapie erzielt werden [93]. Die Chemotherapie sollte schnellstmöglich nach Diagnose eingeleitet werden und umfasst vier bis sechs Zyklen. Patienten mit VLD und LD sind potenziell kurativ behandelbar. Bei VLD erfolgt zunächst eine Resektion des malignen Gewebes mit anschließender adjuvanter Chemotherapie. Eine prophylaktische Bestrahlung des Schädels (PCI, „*prophylactic cranial irradiation*“) und wenn möglich eine postoperative Bestrahlung von residualem Tumorgewebe wird empfohlen. Patienten mit LD erhalten eine Chemotherapie und eine frühe, simultane Strahlentherapie der Primärtumorregion. Diese Kombination erhöht die 3-Jahres-Überlebensrate um 5 % [93]. Zusätzlich wird ebenfalls eine PCI durchgeführt. Beim ED ist nur eine palliative Behandlung des Patienten möglich. Neben der Kombinationschemotherapie werden je nach klinischer Situation lokale Maßnahmen, wie z. B. Bestrahlung, durchgeführt. Bei Ansprechen der Chemotherapie erfolgt zusätzlich eine PCI.

Trotz hoher Ansprechraten der Erstlinientherapie, erfolgt ein Progress meist schon innerhalb eines Jahres [97]. Man unterscheidet hierbei zwischen vier Arten des Rezidivs, wodurch das weitere Therapievorgehen bestimmt wird [93]. Tritt das Rezidiv erst nach über sechs Monaten auf, spricht man von einem Spätrezidiv, welches durch eine erneute Chemotherapie des primären Behandlungsprotokolls therapiert wird. Ein sensibles Rezidiv, gekennzeichnet durch Remission zwischen 90 Tagen und sechs Monaten, wird durch Gabe von Topotecan in Kombination mit anderen Chemotherapeutika behandelt. Bei einem resistenten Rezidiv, welches innerhalb von 90 Tagen erfolgt, wird eine Topotecan Monotherapie verabreicht. Bei keinem Ansprechen der Erstlinientherapie spricht man von einem refraktären Rezidiv.

Zielgerichtete Therapien, wie sie inzwischen beim NSCLC zum Einsatz kommen, blieben beim SCLC bisher ohne Erfolg [93, 94, 97]. Auf Grund der Überexpression der Tyrosinkinase C-Kit wurde eine Therapie mit Imatinib, einem Tyrosinkinaseinhibitor, in mehreren Studien untersucht, erfüllte die Erwartungen jedoch nicht [98-100]. Möglicher Grund hierfür könnte eine fehlende Mutation im C-Kit bei SCLC sein, weshalb Imatinib C-Kit nicht inhibieren kann [97]. Auch Vandetanib, ein Tyrosinkinase-Inhibitor mit Affinität zu VEGFR und EGFR, zeigte keine Wirkung [101]. Anti-angiogene Therapien mit Bevacizumab [102, 103], Thalidomid [104] oder Cediranib [105] lieferten ebenfalls schlechte Ergebnisse und auch Therapien gegen BCL-2 [105] blieben erfolglos. Immunotoxin-basierte Therapien befinden sich aktuell noch in Entwicklung [94]. Ein über Phage Display generierter, rekombinanter scFv-Saporin Antikörpern gegen ALCAM/CD166 zeigte eine toxische Wirkung gegen SCLC-Zellen *in vitro* [106]. Lorvotuzumab Mertansine (IMGN901), ein Antikörper-Wirkstoff-Konjugat gegen NCAM/CD56, wurde in einer Phase II Studie für die Erstlinientherapie des SCLC in Kombination mit Carboplatin und Etoposid untersucht. Nachdem keine Verbesserung des progressionsfreien Überlebens im Vergleich zu Carboplatin/Etoposid alleine gezeigt werden konnte und es zu infektionsbedingten Sterbefällen kam, wurde die Studie abgebrochen [107]. Trotz dieser bisher enttäuschenden Ergebnisse bleibt das Interesse an zielgerichtete Therapien bestehen, um die Prognose bei SCLC-Patienten zukünftig zu verbessern [95].

Die mittlere Überlebenszeit beim SCLC beträgt unbehandelt drei Monate, bei angemessener Behandlung im LD Stadium 14 - 20 Monate und beim ED 8 - 12 Monate. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt beim LD zwischen 10 und 20 % und beim ED unter 1 % [93]. Gründe für die sehr kurze Überlebenszeit sind das schnelle Tumorwachstum und die Entwicklung von Resistenzen. Außerdem ist die Krankheit in den meisten Fällen zum Zeitpunkt der Diagnose bereits weit fortgeschritten und metastasiert; bei 25 % der Patienten liegen zu diesem Zeitpunkt schon Hirnmetastasen vor [95]. Prognostisch relevant sind außerdem der Allgemeinzustand des Patienten, das Vorhandensein von Komorbiditäten, der Laktatdehydrogenase-Wert und das Geschlecht, wobei Frauen insgesamt eine

bessere Prognose als Männer haben. Auf Grund der sehr schlechten Prognose beim SCLC werden neue Therapiemöglichkeiten dringend benötigt.

1.7 Zielsetzung

Aufgrund ihrer hohen Spezifität und Affinität spielen Antikörper in der Diagnose und Therapie von malignen Erkrankungen eine immer größere Rolle [8]. Seit Entwicklung der Hybridomatechnologie im Jahr 1975 wurde intensiv an der Herstellung und Weiterentwicklung von Antikörpern geforscht [7]. Dennoch besteht weiterhin ein großer Bedarf an spezifischen Antikörpern, da durch genomische und proteomische Untersuchungen immer weitere Zielstrukturen entschlüsselt werden. Eine Möglichkeit zur Generierung hoch spezifischer, humaner Antikörper ist die Phage Display Technologie. Auf Grund der beschriebenen Nachteile beim Standardselektionsverfahren des Phage Displays soll im Rahmen dieser Dissertation die *On Slide* Selektion auf *ex vivo* Material weiter entwickelt werden. Die Selektion wird hierbei auf immobilisiertem, Formalin-fixiertem, in Paraffin-eingebettetem (FFPE) Patientenmaterial, wie es routinemäßig in den Pathologien vorkommt, durchgeführt. Hierdurch sollen krankheitsrelevante Antikörper auf komplexen Antigenstrukturen generiert werden, die sowohl für die Diagnose als auch für die Therapie eingesetzt werden können. Entscheidend für eine erfolgreiche Selektion direkt auf Gewebe ist die Zugänglichkeit der Epitope [58]. Aus diesem Grund werden verschiedene Antigendemaskierungen durchgeführt, wie zum Beispiel hitzeinduzierte und auch proteolytische Epitopfreilegungen. Zur Minimierung unspezifischer Bindungen werden die Antikörper-exprimierenden Phagen zuvor auf Normalgewebe depletiert.

Für die Etablierung der Methode wird das kleinzellige Bronchialkarzinom (SCLC) verwendet, welches mit einem besonders aggressiven Verlauf und einer sehr schlechten Prognose assoziiert ist [95]. Zum Zeitpunkt der Diagnose liegen bei zwei Dritteln aller Patienten bereits Metastasen vor. Außerdem spricht das sehr frühe Auftreten eines Rezidivs nach Therapie für das Vorhandensein von minimal residualen Tumorzellen [108]. Immuntoxine könnten diese Metastasen und eine minimale Resterkrankung auf Grund der zielgerichteten Wirksamkeit mit geringem Einfluss auf gesundes Gewebe abtöten. Im Gegensatz zu nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen gibt es für das SCLC bislang keine etablierten zielgerichteten Therapien oder immuntherapeutischen Ansätze, weshalb hier dringender Handlungsbedarf besteht [97].

Ein potentieller diagnostischer Einsatz der in dieser Arbeit generierten Antikörper soll mittels ELISA, Durchflusszytometrie und Immunhistochemie überprüft werden. Für eine mögliche therapeutische Anwendung der Antikörper wird ein Fusionsprotein aus scFv Antikörper und einer modifizierten Version des *Pseudomonas* Exotoxin (ETA', PE40) aus *Pseudomonas aeruginosa* hergestellt. Bei dem

PE40 ETA' Toxin wurde die Bindungsdomäne entfernt, wodurch unerwünschte Bindungen des Toxins verhindert werden. Das zytotoxische Potential der Fusionsproteine soll mit Hilfe von Proliferations- und Apoptose-Assays untersucht werden.

Mit Hilfe der *On Slide* Selektion direkt auf Patientengewebe könnten neue, tumorassoziierte Epitope auf malignen Zellen entdeckt werden. Da teilweise große Unterschiede, wie z.B verschiedene Mutationen, innerhalb von Patienten mit der gleichen Krebsentität bestehen [61], könnte diese Methode einen wichtigen Beitrag zur personalisierten Medizin leisten.

2 Material

2.1 Geräte & Software

Die folgende Liste enthält nur Geräte, deren Austausch einen möglichen Einfluss auf die Versuchsergebnisse haben könnte. Standardgerätschaften werden hierbei nicht aufgelistet.

Geräte

Gerät	Bezeichnung; Hersteller
Agarosegel-Dokumentationsstation	DeVision DBox; Decon DC Science Tec
Blotkammer	XCell SureLock Mini-Cell Electrophoresis System; Life Technologies
Brutschrank	HERAcell 150i; Thermo Scientific
CCD Digitalkamera	KY-F75U 3-CCD Digital Kamera; JVC
Drucker Agarosegele	P93D; Mitsubishi
Durchflusszytometer	Guava EasyCyte 5HT; Merck Millipore
Elektrophoresekammer	Mini-PROTEAN Tetra Cell; Bio-Rad Technologies
ELISA-Reader	Sunrise-Basic; Tecan Austrian GmbH
Fluoreszenzmikroskop	Axio Imager.Z2 + Metafer Slide Scanning Platform; Zeiss/ MetaSystems GmbH
Generator	E443 2 Microcomputer Electrophoresis Power Supplies; Consort Standard Power Pack P25; Biometra
Heizblock	Thermomixer Comfort; Eppendorf
Inkubationsschüttler	KS 4000 ic control; IKA-Werke GmbH & Co. KG Schüttler KS15 mit Inkubationshaube TH 15; Edmund Bühler GmbH
Inversmikroskop	DM IL; Leica
Ionenaustauscher	Seradest SD 2000 Vario; Seral Erich Alhäuser GmbH Direct-Q 3; Merck Millipore
Kryo-Einfriergerät	Mr. Frosty; Thermo Scientific
Lichtmikroskop	Axioskop 50; Carl Zeiss
Mikroplatten Wascher	Hydroflex ELISA-Washer; Tecan Austria GmbH
Mikrotom	Jung SM2000R; Leica Microsystems
PCR-Gerät	Hybaid PCR-Sprint Thermal Cycler; Thermo Scientific Veriti 96-Well Fast Thermo Cycler; Life Technologies
PCR-Working Station	DNA/RNA UV-Cleaner UVT-B-AR; Biosan
Photometer	NanoDrop ND-1000; Thermo Scientific Ultrospec 10; American Biosciences
Sequencer	3730xl DNA Analyzer; Hitachi
Sterilwerkbank	MSC-Advantage Class II Biological Safety Cabinet; Thermo Scientific
Ultraschallstab	Branson Digital Cell Disruptor; Branson
Ultrazentrifuge	Sorvall Ultra Pro 80; Thermo Scientific

Gerät	Bezeichnung; Hersteller
UV-Tisch	ECX-26-M; Vilber Lourmat IL-200-; Bachhofer Laboratoriumsgeräte GmbH
Zählkammer	Neubauer hellinig; Carl Roth GmbH
Zentrifugen	5415 R; Eppendorf AG Rotanta/TRC; Hettich GmbH & Co.KG Sigma 3K30; Sigma Laborzentrifugen GmbH

Software

Bezeichnung	Anwendung	Hersteller
GelAnalyzer 2010	Proteingehaltsbestimmung	GelAnalyzer.com
GraphPad Prism 6	statistische Datenauswertung	GraphPad Software, Inc.
InCyte 2.7	Durchflusszytometrie	Merck Millipore
Isis color fluorescence imaging system	Konfokalmikroskopie	MetaSystems GmbH
Lasergene Core Suite	Sequenzanalysen, Vektor- & Primerdesign, Alignments	DNA STAR
Office 2010	Text- & Bildbearbeitung	Microsoft
Photoshop CS5	Bildbearbeitung	Adobe
KY-LINK	lichtmikroskopische Aufnahmen	JVC
Sequencing Analysis 5.3.1	Sequenzanalysen	Life Technologies
XFluor	ELISA	Tecan

2.2 Verbrauchsmittel & Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
2xYT Medium	Becton Dickinson	244020
6 x Ladepuffer	Thermo Scientific	# R0631
7-Amino-Actinomycin (7AAD)	BD Biosciences	559925
8-Kammer Zellkulturobjektträger	BD Falcon	354118
10 x Roti-Block	Carl Roth GmbH	A151.2
Agarose	Biozym	850070
Ampicillin	Sigma-Aldrich	A9518-5g
Annexin Bindungspuffer	Life Technologies	V13241
Annexin V-Alexa Fluor 488	Life Technologies	V13241
Bacto Agar	Becton Dickinson	214010
Betain	Sigma-Aldrich	B2629-100G
Big Dye Mix	Life Technologies	4337455
Big Dye Puffer	Life Technologies	4337455
Blotting Filterpapier	Merck Millipore	IBFP0785C
Bovines Serum Albumin	Sigma-Aldrich	A7906-100G
DAB (Metal Enhanced)	Thermo Scientific	34065
DAPI (VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI)	Vector Laboratories	H-1200
dNTP Mix	GE Life Sciences	28-4065-57

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
DTT-Lösung	AppliChem	A3668,0100
ECL Prime	GE Healthcare	RPN2232
EDTA-Puffer IHC	Leica	AR9640
Eindeckelmedium	Thermo Scientific	36000
Entwicklungslösung	Carestream Dental	5285929
Ethanol	Sigma Aldrich	32205-2,5L
Ethidiumbromid (1 % Lösung)	Carl Roth GmbH	2218
Eukaryotisches Einfriermedium	Life Technologies	12648-010
Fettstift	Dako Cytomation	S 2002
Feuchte Kammer	Simport	M920-2
Fixierungslösung	Carestream Dental	5285937
Fötales Kälberserum (FKS)	Life Technologies	10270-106
FuGENE HD Transfektionsreagenz	Promega	E2311
Glucose	Sigma-Aldrich	1001052985
Glycerol	Carl Roth GmbH	7530.1
Hämotoxylin (Harris Modified)	Thermo Scientific	36000
Helferphage M13K07	New England Biolabs	N0315S
Heparin-Blut Röhrchen (S-Monovette)	Sarstedt	01.1604
Hi-Di Formamid	Life Technologies	4311320
Hyperphage M13K07ΔpIII	PROGEN Biotechnik GmbH	PRHYPE-XS
IHC Blockpuffer	Thermo Scientific	36000
Immunoplatte (Nunc Maxisorb)	Thermo Scientific	442404
IPTG	Carl Roth GmbH	2316.4
Kanamycin	Life Technologies	11815-024
Lymphoprep Reagenz	Axis-Shield	1114544
MEM α Medium	Life Technologies	32561-029
Mercaptoethanol	Sigma Aldrich	M3148-25ML
Methanol	Sigma Aldrich	32213-1.5L
Milchpulver	Carl Roth GmbH	T145.1
MgCl ₂ (für PCR)	Life Technologies	4311820
Ni-NTA Superflow Säulen	Qiagen	30721
NuPAGE 4 - 12 % Bis-Tris Gradientengele	Life Technologies	NP0323
Paraformaldehyd	Affymetrix	19943 1LT
PCR-Puffer, 10 x	Life Technologies	4311820
Peroxidase Suppressor	Thermo Scientific	36000
Pferdeserum	American Type Culture Collections (ATCC)	30-2040
Phenazinmethosulfat (PMS)	Serva Electrophoresis	32030
Polyethylenglycol 6.000	Carl Roth GmbH	0158.4
Polyoxyethylensorbitan Monolaurat (Tween 20)	Sigma-Aldrich	P-1379
Ponceau-Lösung	Sigma-Aldrich	P7170-1L
Proteinase K	Leica	AR9551
PVDF Membran (Transfer Membran Immobilon-P)	Merck Millipore	IPVH00010
Roche Complete Protease Inhibitor Tablette ohne EDTA	Roche	04693122001
Röntgenfilm (Hyperfilm ECL)	GE Life Sciences	72824
RPMI Medium	Life Technologies	61870-044

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
Sorbitol	Sigma-Aldrich	S6021-1KG
Sterilfilter 0,22 µm 0,45 µm	Merck Millipore Merck Millipore	SLGV033RS SLHV033RS
Streptavidin-PE	BioLegend	405203
Tetramethylbenzidin (TMB)	Thermo Scientific	34028
Tissue Micro Array (TMA)	US Biomax, Inc.	SCLC: LC802a gesunde Organe: BN1002a
Tomlinson Antikörperbibliothek I & J	Medical Research Council, Centre for Protein Engineering, Cambridge	
Triethylamin	Sigma-Aldrich	T0886-500ML
Triton-X-100	AppliChem	A1388,0500
Trypanblau	Life Technologies	15250-061
Trypsin-EDTA	Life Technologies	25200-056
Vakuumfiltration	TPP	99500
Vivaspin Turbo 15	Sartorius	VS15T21
Waymouth Medium	Life Technologies	31220-023
XTT	Serva Electrophoresis	38450
Xylol	SAV LIQUID Production GmbH	XTR-5000-97-1

2.3 Puffer, Lösungen & Medien

Alle Puffer, Lösungen und Medien wurden in doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O) angesetzt. Wenn erforderlich wurden sie anschließend entweder für 20 min bei 121 °C autoklaviert oder durch einen Filter mit 0,22 µm Porengröße steril filtriert.

Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
2 % MPBS	2 % Milchpulver in PBS
4 % MPBS	4 % Milchpulver in PBS
Antarktische Phosphatase Puffer	50 mM Bis-Tris-Propan HCl, 1 mM MgCl ₂ , 0,1 mM ZnCl ₂ , pH 6,0
Blocking-Solution	1 x Rothi-Block
Blotpuffer	70 % ddH ₂ O, 20 % Methanol, 10 % 10 x Towbin
Citrat Puffer für IHC	Lösung 1: 0,1 M Zitronensäure-Monohydrat Lösung 2: 0,1 M Tri-Natriumcitrat-Dihydrat 1,8 ml Lösung 1, 8,2 ml Lösung 2, 90 ml ddH ₂ O
Coomassie-Lösung	40 % Methanol, 10 % Eisessig, 50 % ddH ₂ O, 0,25 % Coomassie-Brilliant Blau G250
Elutionspuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8,0
Equilibrierungspuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0
FACS Waschpuffer	1 x PBS, 0,2 % BSA, 0,1 % NaN ₃
Homogenisierungspuffer	25 mM Tris-HCl, 320 mM Saccharose, 1 Protease Inh. Tablette, pH 7,4
IHC Waschpuffer	Tris-Puffer, 0,05 % Tween 20
Lysepuffer	PBS, 1 % Triton-X-100, Roche Complete Protease Inhibitor (ohne EDTA)

Material

Bezeichnung	Zusammensetzung
NuPAGE MES SDS Laufpuffer	50 mM MES, 50 mM Tris-Base, 0,1% SDS, 1 mM EDTA, pH 7,3
NuPAGE LDS Sample Puffer	141 mM Tris-Base, 2 % LDS, 10 % Glycerol, 0.51 mM EDTA, 0.22 mM SERVA Blue G, 0.175 mM Phenol Red, 100 mM DTT, pH 8,5
PBS, 10 x	1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 0,1 mM Na ₂ HPO ₄ , 17,6 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
PBST	1 x PBS, 0,1 % Tween 20
PCR-Puffer, 10 x	150 mM, Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8,0
PEG/NaCl-Lösung	20 % PEG 6.000, 2,5 M NaCl
Phosphatpuffer, 50 x	3,6 M K ₂ HPO ₄ , 0,85 M KH ₂ PO ₄
Restriktionsverdau Puffer (NEBuffer 4)	50 mM KCH ₃ CO ₂ , 20 mM Tris-Acetat, 10 mM Mg(CH ₃ COO) ₂ , 1 mM DTT
Resuspendierungspuffer	50 mM Tris-HCl, pH 7,4
T4 DNA Ligasepuffer	50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM DTT, 1 mM ATP, pH 7,5
TAE Puffer, 50 x	242 g Tris, 57,1 ml Essigsäure, 0,5 M EDTA (pH 8,0), ad 1 L ddH ₂ O
TBS, 20 x	18 g Tris-Base, 137 g HCl, 175,6 g NaCl, ad 1 L ddH ₂ O
TBST	1 x TBS, 0,1 % Tween 20
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0
Towbin, 10 x	1,92 M Glycin, 250 mg SDS, 0,25 M Tris
Tris-HCl (1 M)	157,6 g, ad 1 L ddH ₂ O
Tris-Puffer, 20 x	18 g Tris-Base, 137 g Tris-HCl, 175,6 g NaCl, ad 1 L ddH ₂ O
Waschpuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8,0
Zelldissoziationslösung	0,04 M Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0,15 M NaCl, pH 7,4

Medien

Bezeichnung	Zusammensetzung
2xYT-Agar	16 g Casein, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, 15 g Bacto Agar, ad 1 L ddH ₂ O
2xYT-Medium	16 g Casein, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, ad 1 L ddH ₂ O
2xYT _{Amp/Gluc} -Medium	2xYT Medium, 100 µg/ml Ampicillin, 1 % Glucose
2xYT _{Amp/Kana} -Medium	2xYT Medium, 100 µg/ml Ampicillin, 50 µg/ml Kanamycin
2xYT _{Amp/Kana/IPTG} -Medium	2xYT Medium, 100 µg/ml Ampicillin, 50 µg/ml Kanamycin, 0,25 mM IPTG
Prokaryotisches Einfriermedium	2xYT-Medium, 15 % Glycerol, 1 % Glucose, 100 µg/ml Ampicillin
M9 Minimal Agar	Lösung 1: 5,85 g Agar, 390 ml ddH ₂ O Lösung 2: 1,25 g NaCl, 2,5 g NH ₄ Cl, 16,95 g Na ₂ HPO ₄ , 7,5 g KH ₂ PO ₄ , 500 ml ddH ₂ O Lösung 3: 1 M MgSO ₄ Lösung 4: 1 M CaCl ₂ Lösung 5: 40 % Glucose Lösung 6: 1 mg Thiaminhydrochlorid, 10 ml ddH ₂ O 11,7 ml Lösung 1, 3 ml Lösung 2, 30 µl Lösung 3, 1,5 µl Lösung 4, 150 µl Lösung 5, 6 µl Lösung 6, 150 µl ddH ₂ O
SOC Medium	2 % Pepton, 0,5 % Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 20 mM Glucose
TB Medium	12 g Trypton, 24 g Hefeextrakt, 4 ml Glycerol, ad 1 L ddH ₂ O

2.4 Molekulargewichtsmarker

Zur Bestimmung der Größe von DNA-Banden im Agarosegel und von Proteinbanden bei der Coomassie-Färbung und im Western Blot wurden folgende Molekulargewichtsmarker eingesetzt:

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder	Thermo Scientific	SM1331
GeneRuler Low Range DNA Ladder	Thermo Scientific	SM1193
Magic Marker XP	Thermo Scientific	LC5602
Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder	Thermo Scientific	26634

2.5 Enzyme & Reaktionskits

Enzyme

Bezeichnung & Einsatzkonzentration	Erkennungssequenz	Hersteller	Bestellnummer
Antarktische Phosphatase [5 U]	-	New England Biolabs	M0289S
<i>Ascl</i> [10 U]	GGCGCGCC	New England Biolabs	R0558S
<i>DpnI</i> [10 U]	Gm ⁶ ATC	Thermo Scientific	#ER1705
<i>HindIII-HF</i> [20 U]	AAGCTT	New England Biolabs	R3104S
<i>NotI-HF</i> [20 U]	GCGGCCGC	New England Biolabs	R3189S
<i>Pfu</i> DNA Polymerase [2,5 U]	-	Thermo Scientific	#EP0501
<i>SacI-HF</i> [20 U]	GAGCTC	New England Biolabs	R3156S
<i>SfiI</i> [20 U]	GGCCNNNNNGGCC	New England Biolabs	R0123S
T4 DNA Ligase [400 U]	-	New England Biolabs	M0202S
<i>Taq</i> DNA Polymerase (AmpliTaq Gold LD) [1,25 U]	-	Life Technologies	4311820
<i>XbaI</i> [20 U]	TCTAGA	New England Biolabs	R0145S
<i>XhoI</i> [20 U]	CTCGAG	New England Biolabs	R0146S

Reaktionskits

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
ABC Ultra Sensitive Staining Kit	Thermo Scientific	32050
BCA-Assay	Thermo Scientific	23227
DyEx 2.0 Spin Kit	Qiagen	63206
JetQuick Gel Extraktionskit	Genomed	41-0050
PCR Purification Kit	Qiagen	28106
Pierce Peroxidase Detection Kit	Thermo Scientific	36000
Plasmid Mini Kit	Qiagen	12125
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen	27106

2.6 Antibiotika

Bezeichnung	Stocklösung	Konzentration	Hersteller	Bestellnummer
Ampicillin	50 mg/ml	100 µg/ml	Sigma Aldrich	A9518-5g
Kanamycin	50 mg/ml	50 µg/ml	Life Technologies	11815-024
Penicillin/ Streptomycin	10.000 U/ml Penicillin 10.000 µg/ml Strep.	1 % in Kulturmedium	Life Technologies	15140-122
Zeocin	100 mg/ml	100 µg/ml	Life Technologies	R25001

2.7 Antikörper

Bezeichnung	Wirt	Anwendung	Hersteller	Bestellnummer
Anti-ETA' TC-1	monokl. Maus	Durchflusszytometrie, 1:100	Fraunhofer Institut IME, Aachen	-
Anti-Human IgG (H+L) F(ab') ₂ HRP	polykl. Ziege	Western Blot, 1:100.000	Merck Millipore	AQ112P
Anti-Human IgG (Fab') ₂ Biotin	polykl. Maus	Durchflusszytometrie, 0,3 µg Immunhistochemie, 1,5 µg	Jackson Immuno Research	209-065-097
Anti-M13	monokl. Maus	Durchflusszytometrie, 1:5.000	GE Healthcare	27-9420-01
Anti-M13 HRP	monokl. Maus	ELISA, 1:5.000	GE Healthcare	27-9421-01
Anti-Maus IgG/IgM FITC	polykl. Ziege	Durchflusszytometrie, 1 µg	BD Biosciences	555988
Anti-Maus IgG (H+L) HRP	polykl. Kaninchen	ELISA, 1:25.000	Antibodies- online	ABIN101782
Anti-Maus HRP	polykl. Kaninchen	WB, 1:5.000	Dako	P0260

2.8 Vektoren

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Plasmidvektoren für die Selektion von Antikörpern, deren Umwandlung in verschiedene Antikörperformate und deren Expression verwendet. Nachfolgend sind die Expressionskassetten der verwendeten Vektoren schematisch dargestellt.

Der pIT2 Vektor (Abb. 5) enthält die Tomlinson Antikörperbibliotheken I und J und wurde zur Herstellung von scFv-präsentierenden Phagenpartikeln verwendet. In diesem Phagemid sind die scFv Gensequenzen direkt oberhalb des Nebenhüllproteingens gIII kodiert, so dass die scFv's auf der Oberfläche exprimiert werden. Die Expression erfolgt hierbei über Regulation durch einen Lac-Promotor.

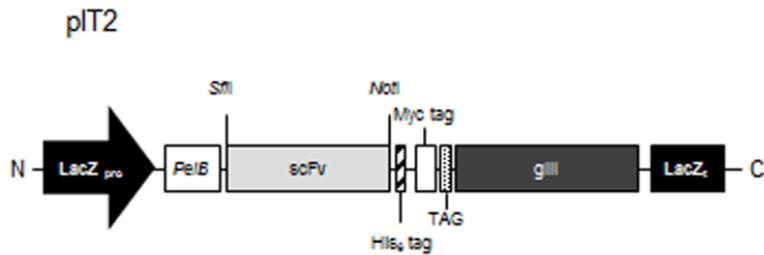


Abb. 5: Expressionskassette des Phagemids pIT2

Unter der Kontrolle des LacZ-Promotors ($LacZ_{pro}$) und Terminators ($LacZ_t$) ermöglicht das pIT2 Phagemid die Expression von scFv-pIII Fusionsproteinen zur Darstellung der scFv's auf der Phagenoberfläche. Die *Erwinia carotovora* Pektatlyase B (*PeIB*) Leadersequenz sorgt für die Translokation der scFv-pIII Fusionsproteine ins Periplasma der Bakterien, wo sie bei der Produktion neuer Phagenpartikel als Hüllproteine eingebaut werden. Das amber Stopcodon TAG zwischen dem scFv und gIII ermöglicht die Produktion von löslichen scFv's ohne pIII in non-Suppressorstämmen. Über das His₆ tag und Myc tag können die scFv's aufgereinigt und detektiert werden.

N = N-terminales Ende; C = C-terminales Ende

Mit dem pMS2 Vektor (Abb. 6) wurden die scFv-Fc Fusionsproteine in eukaryotischen Zellen hergestellt. Dieser bicistronische Vektor enthält einen murinen konstanten Teil, der zur Detektion der scFv-Fc Fusionsproteine dient. Der Cytomegalievirus (CMV) Promotor sorgt für eine starke Expression, während die vorgeschaltete Immunglobulin Kappa Leadersequenz zur Sezernierung der Fusionsproteine in das Kulturmedium führt. Durch das kotranslatierte, grüne Fluoreszenzprotein kann die Transfektionseffizienz überprüft werden.

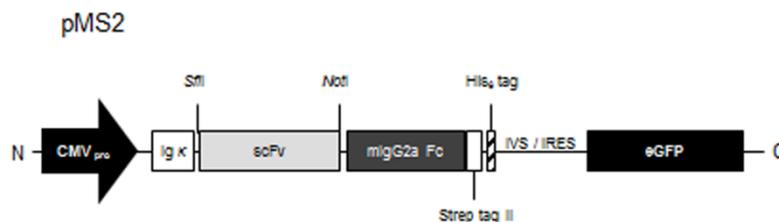


Abb. 6: Expressionskassette des eukaryotischen Expressionsvektors pMS2

Der bicistronische Vektor pMS2 ermöglicht die eukaryotische Expression der scFv-Fc Fusionsproteine. Das scFv Fragment befindet sich im Leseraster mit einer Maus Immunglobulin Gamma 2a konstanten Domäne (mlgG2a Fc), die den Nachweis über Standard anti-Maus Antikörper ermöglicht. Der Cytomegalievirus Promotor (CMV_{pro}) führt zu einer starken Expression des scFv-Fc Fusionsproteins, während die Immunglobulin Kappa Leadersequenz für die Sekretion in den Kulturüberstand sorgt. Das His₆ tag und das Strep tag II können zur Aufreinigung genutzt werden. Die interne ribosomale Eintrittsstelle (IVS/IRES) sorgt für eine Kotranslation eines verstärkten grün-fluoreszierenden Proteins (eGFP), wodurch die Transfektion in eukaryotische Zellen überprüft werden kann.

N = N-terminales Ende; C = C-terminales Ende

Der pGAL Vektor (Abb. 7) diente zur Umwandlung der scFv's in Fab-Fragmente. Der Vektor enthält eine humane konstante Kappa-Kette und eine humane CH1 Region von Immunglobulin Gamma 1, an die die entsprechenden variablen Ketten oberhalb kloniert wurden.

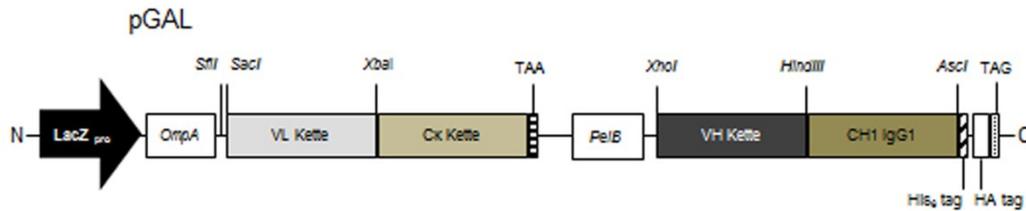


Abb. 7: Expressionskassette des Fab-Vektors pGAL

Der pGAL Vektor enthält eine humane konstante Kappa-Kette (Ck Kette) und eine humane Immunglobulin Gamma 1 CH1 Region (CH1 IgG1), wodurch die Umwandlung von scFv's in Fab-Fragmente ermöglicht wird. Hierfür werden die variable leichte Kette (VL Kette) und variable schwere Kette (VH Kette) durch die Restriktionsenzyme *SacI* und *XbaI* bzw. *XhoI* und *HindIII* geschnitten und vor ihren entsprechenden konstanten Teil kloniert. Das Outer-Membran Protein A (*OmpA*) und die *Erwinia carotovora* Pektatlyase B (*PelB*) Leadersequenz sorgen für die Translokation der Fab-Fragmente ins Periplasma der Bakterien, wobei die Expression über den LacZ-Promotor ($LacZ_{pro}$) reguliert wird. Das His₆ und HA tag können zur Aufreinigung genutzt werden.

N = N-terminales Ende; C = C-terminales Ende; TAA = ochre Stopcodon; TAG = amber Stopcodon

Nach Umklonierung der Fab-Fragmente in den pMT2 Vektor (Abb. 8), erfolgte die prokaryotische Expression, welche unter der Regulation des T7 Promotors liegt. Die Pektatlyase B Leadersequenz führt zur Translokation der schweren und leichten Kette ins Periplasma, wo die beiden Ketten mit einander verbunden werden. Über das His₆ tag oder das Strep tag II können die Fab-Fragmente aufgereinigt werden.

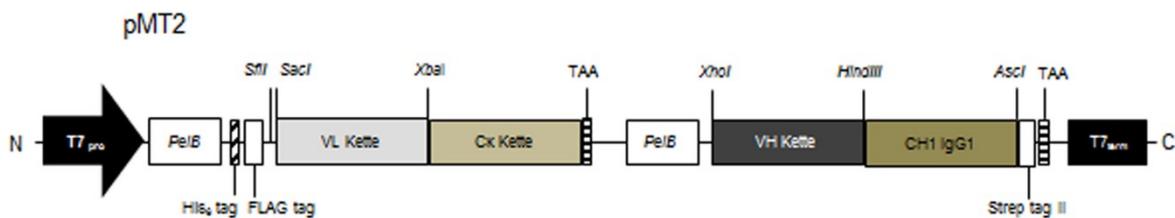


Abb. 8: Expressionskassette des prokaryotischen Expressionsvektors pMT2

Zur prokaryotischen Expression der Fab-Fragmente wurden diese durch die Restriktionsenzyme *SfiI* und *AscI* aus pGAL geschnitten und in den pMT2 Vektor kloniert, wobei der T7 Promotor ($T7_{pro}$) und Terminator ($T7_{term}$) für eine starke Expression sorgen. Die *Erwinia carotovora* Pektatlyase B (*PelB*) Leadersequenz sorgt hierbei für die Translokation der Fab-Fragmente ins Periplasma der Bakterien, wo die schwere und leichte Kette mit einander verbunden werden. Über das His₆ tag, das FLAG tag und das Strep tag II können die Fab-Fragmente aufgereinigt und detektiert werden.

N = N-terminales Ende; C = C-terminales Ende; VL = variable leichte Kette; Ck = konstante Kette Kappa, VH = variable schwere Kette; CH1 IgG1 = konstante Region 1 von Immunglobulin Gamma 1; TAA = ochre Stopcodon

Die Herstellung der Immuntoxine erfolgte in dem prokaryotischen Expressionsvektor pMT-ETA' (Abb. 9), in dem eine modifizierte Version des *Pseudomonas* Exotoxin A (ETA') enthalten ist. Die Expression der Immuntoxine wird durch den T7 Promotor reguliert, während die Pektatlyase B Leadersequenz zu einer Anreicherung der Immuntoxine im Periplasma führt.

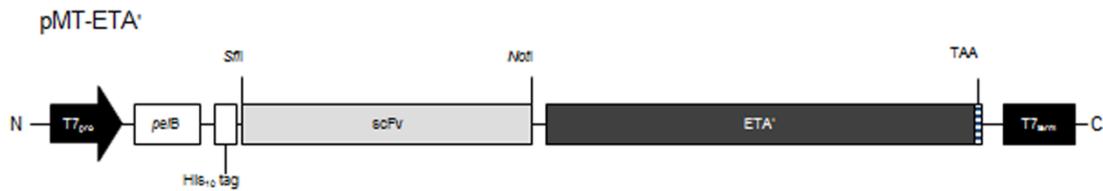


Abb. 9: Expressionskassette des rekombinanten Immuntoxin-Vektors pMT-ETA'

Zur Herstellung von Immuntoxinen wurden die scFv's durch die Restriktionsenzyme *SfiI* und *NotI* geschnitten und in den pMT-ETA' Vektor kloniert. Die Expression wird über den T7 Promotor (T7_{pro}) und T7 Terminator (T7_{term}) reguliert. Die *Erwinia carotovora* Pektatlyase B (*PeIB*) Leadersequenz führt zur Translokation der Immuntoxine ins Periplasma der Bakterien. Die Aufreinigung wird durch das His₁₀ tag ermöglicht.

2.9 Primer

Alle Oligonukleotid-Primer wurden mit der Lasergene Software von DNA-STAR entworfen und über MWG Eurofins erworben. Die nachfolgende Tabelle enthält die Primer zur Sequenzierung der DNA Fragmente in den verschiedenen Vektoren und die Primer zur Amplifikation der variablen schweren und leichten Ketten mit entsprechenden Restriktionsschnittstellen für die Umwandlung in Fab Fragmente. Die Restriktionsschnittstellen sind hierbei unterstrichen. Die Primer für die ortsgerichtete Mutagenese wurden für jeden scFv individuell entworfen. Eine Auflistung dieser Primer befindet sich im Anhang (Mutageneseprimer).

Bezeichnung	Sequenz 5' - 3'
3' mouse Fc	GAT GAA GAC GGA TGG TCC AC
ETA' 3'	CCA GCG GCA GGT GGC AGG
pComb3XSS 3'	CGT TTG CCA TCT TTT CAT AAT C
pComb3XSS 5'	GCT TCC GGC TCG TAT GTT GTG T
pGAL 3' kurz	CCA TGG CTG GTT GGG CAG CG
pGAL 5' kurz	GTC ACA AAG AGC TTC AAC AGG
pIT2 3'	CTA TGC GGC CCC ATT CA
pIT2 5'	CAG GAA ACA GCT ATG AC
pMS2 3'	GTA CTC ACC CCA ACA GCT GG
pMS2 5'	CCA AGC TGG CTA GCC ACC ATG
pMT2 3'	CTA CAG GGC GCG TCC CAT TC
pMT2 5'	GAA TTG TGA GCG GAT AAC AAT TC
pMT-ETA' 3'	TAC AGG GCG CGT CCC ATT CG
pMT-ETA' 5'	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
TL VH HindIII 3'	TCG ATG ACT <u>AAG CTT</u> CGA GAC GGT GAC CAG GGT TCC
TL VH XhoI 5'	AGT CAT CGA <u>CTC GAG</u> ATG GCC GAG GTG CAG CTG TTG
TL VL SacI 5'	AGT CAT CGA <u>GAG CTC</u> GAC ATC CAG ATG ACC CAG TC
TL VL XbaI 3'	TCG ATG ACT <u>TCT AGA</u> TTT GAT TTC CAC CTT GGT CC

2.10 Zelllinien, Bakterienstämme & Patientenmaterial

Zelllinien

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
DMS 273	Kleinzelliges Bronchialkarzinom	Dr. Rajkumar Savai, Max Planck Institut für Herz- und Lungenforschung, Bad Nauheim
HEK293T	Humane embryonale Nierenzellen	Prof. Dr. Claudia Rössig, Pädiatrische Hämatologie und Onkologie Universitätsklinikum Münster
NALM-6	Akute lymphatische Leukämie	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), ACC 128
NCI-H69	Kleinzelliges Bronchialkarzinom	Dr. Rajkumar Savai, Max Planck Institut für Herz- und Lungenforschung, Bad Nauheim
NCI-H82	Kleinzelliges Bronchialkarzinom	Dr. Rajkumar Savai, Max Planck Institut für Herz- und Lungenforschung, Bad Nauheim
NK92-C1	Natürliche Killerzellen	Prof. Dr. Claudia Rössig, Pädiatrische Hämatologie und Onkologie Universitätsklinikum Münster

Bakterienstämme

Bezeichnung	Genotyp	Herkunft/ Bestellnummer
BL21(DE3)	<i>fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS</i> <i>λ DE3 = λ sBamHI ΔEcoRI-B</i> <i>int::(lac::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5</i>	New England BioLabs; C2527 H
K12 ER2925	<i>ara-14 leuB6 fhuA31 lacY1 tsx78 glnV44 galK2</i> <i>galT22 mcrA dcm-6 hisG4 rfbD1</i> <i>R(zgb210::Tn10)TetS endA1 rpsL136 dam13::Tn9</i> <i>xylA-5 mtl-1 thi-1 mcrB1 hsdR2</i>	New England BioLabs; E4109 S
TG1's	F'[traD36 lacI ^q Δ(lacZ) M15 proA ⁺ B ⁺] glnV (supE) thi-1 Δ(mcrB-hsdSM)5 (r _K ⁻ m _K ⁻ McrB ⁻) thi Δ(lac-proAB)	Zymo Research, T3017
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1</i> <i>lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]</i>	Agilent Technologies, 200249

Patientenmaterial

Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete FFPE Patientenmaterial für die *On Slide* Selektion stammte aus dem Archiv des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Gießen. Das Material wurde nach Zustimmung der Ethik-Kommission der Justus-Liebig Universität Gießen eingesetzt (Referenznummer: 68/13).

3 Methoden

3.1 Zellkultur

Alle zellbiologischen Arbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen. Die verwendeten Lösungen wurden steril erworben, autoklaviert oder mit Hilfe eines Filters der Porengröße 0,22 µm steril filtriert. Alle Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ Begasung in einem Brutschrank kultiviert.

3.1.1 Kultivierung der verwendeten Zellen

Die SCLC Zelllinien NCI-H69 und NCI-H82, die humane embryonale Nierenzelllinie HEK293T und die akute lymphatische Leukämie (ALL) Zelllinie NALM-6 wurden in Rosewell Park Memorial Institute Medium (RPMI) 1640 mit 10 % hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FKS) und 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S) kultiviert. Bei den NCI-H69, NCI-H82 und NALM-6 handelt es sich um Suspensionszellen, wohingegen HEK293T adhärent wachsen. Die adhärente SCLC Zelllinie DMS 273 wurde in Waymouth Medium mit 10 % FKS und 1 % P/S kultiviert. Bei der natürlichen Killerzelllinie NK92-C1 handelt es sich um eine transfizierte Variante von NK92 [109]. In diese Variante wurde episodale humane cDNA eingebracht, die für Interleukin 2 (IL-2) kodiert, so dass diese Zellen ohne den Zusatz von IL-2 in Kultur gehalten werden können. Die Zellen wurden in MEM α Medium mit 12,5 % FKS, 12,5 % Pferdeserum, 0,1 mM Mercaptoethanol und 1 % P/S kultiviert.

Bei dichtem Bewuchs der Kulturflaschen wurden die Zellen passagiert. Die Suspensionzellen wurden hierfür zusammen mit dem Medium komplett aus der Flasche entfernt und in ein 15 ml Röhrchen überführt. Anschließend wurde die Suspension für 5 min bei 250 g zentrifugiert und das Zellpellet in 10 ml entsprechendem Medium aufgenommen und vorsichtig resuspendiert. Ein Teil der Zellen wurde in die Kulturflasche zur weiteren Kultivierung zurückgegeben. Bei den adhären Zellen wurde zunächst das Kulturmedium vom Zellrasen entfernt. Dann wurde in die Flasche 5 ml Zelldissoziationslösung gegeben und bis zum Ablösen der Zellen vom Boden der Flasche im Brutschrank inkubiert. Nach Übertragen der abgelösten Zellen in ein Röhrchen wurden diese für 5 min bei 250 g zentrifugiert. Das Pellet wurde im Anschluss in 10 ml Kulturmedium aufgenommen, resuspendiert und ein Teil der Zellen in eine Kulturflasche überführt. Abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen wurde das Splittverhältnis gewählt (1:2 – 1:20).

3.1.2 Kryokonservierung von Zellen

Eine kurze Lagerung der Zellen (maximal einige Wochen) erfolgte bei -80 °C und für einen längeren Zeitraum in flüssigem Stickstoff. Hierfür wurden mit Hilfe einer Trypanblaufärbung die viablen Zellen gezählt. Bei Trypanblau handelt es sich um einen Farbstoff, der nur in abgestorbene oder perforierte Zellen eindringen kann und diese dadurch blau anfärbt. Die gewünschte Zellzahl wurde in 1 ml Einfriermedium aufgenommen, in ein Kryoröhrchen überführt und stufenweise mit 1 °C/min in einem Kryo-Einfriergerät eingefroren. Die hierfür optimale Zellzahl wurde den Angaben der Datenblätter der jeweiligen Zelllinie entnommen.

Zur Kultivierung wurden die eingefrorenen Zellen aus flüssigem Stickstoff bei Raumtemperatur (RT) aufgetaut und zu 10 ml entsprechendem Zellkulturmedium gegeben. Durch Zentrifugation der Zellen für 5 min bei 250 g wurde das Einfriermedium entfernt, das Zellpellet in 12 ml Medium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche überführt.

3.1.3 Herstellung von peripheren mononukleären Zellen aus humanem Blut

Periphere mononukleäre Blutzellen („*peripheral blood mononuclear cells*“, PBMC's) wurden als Kontrolle bei den Bindungsanalysen der generierten Antikörperfragmente im ELISA und der Durchflusszytometrie eingesetzt. Mit Hilfe einer Dichtegradientenzentrifugation wurden die PBMC's aus humanem Vollblut von gesunden Spendern isoliert. Hierfür wurde Heparinblut im Verhältnis von 1:1 mit RPMI Medium ohne Zusätze verdünnt. In ein 15 ml Röhrchen wurden 3 ml Lymphoprep Reagenz gegeben und vorsichtig mit 5 ml Blut/RPMI überschichtet. Auf Grund der unterschiedlichen Dichte wurden durch 30 min Zentrifugation bei 1.250 g mit ausgeschalteter Bremse die Erythrozyten, die Granulozyten und Zellbruchstücke auf den Boden gedrückt, während sich die PBMC's in einem Ring zwischen Lymphoprep Reagenz und Plasma anreicherten. Die PBMC's wurden vorsichtig abgenommen und in ein 15 ml Röhrchen überführt. Dann wurden die Zellen zwei Mal mit 10 ml RPMI Medium für 5 min bei 1.000 g gewaschen. Anschließend konnte das Zellpellet in 10 ml RPMI mit 10 % FKS und 1 % P/S aufgenommen werden. Zur Aufbewahrung wurden 5×10^6 Zellen in 1 ml Einfriermedium aufgenommen, in ein Kryoröhrchen überführt und bei -80 °C gelagert. 24 h vor Versuchsdurchführung wurde der Inhalt eines Kryoröhrchens in 5 ml RPMI gegeben und 5 min bei 1.000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 3 ml RPMI, 10 % FKS, 1 % P/S aufgenommen und in einer T-25 Zellkulturflasche stehend im Brutschrank inkubiert.

3.1.4 Transfektion von HEK293T Zellen

Für die eukaryotische Expression von scFv-mouse-Fc (scFv-Fc) Fusionsproteinen wurden HEK293T Zellen mit Plasmid-DNA durch Lipofektion transfiziert. Hierfür wurden 2×10^5 Zellen pro Well in 2 ml RPMI mit 10 % FKS, 1 % P/S in einer 6-Well Platte ausplattiert, so dass diese am Folgetag ca. 80 % konfluent bewachsen waren. Am nächsten Tag wurde 1 µg Plasmid mit der 2,5-fachen Menge an FuGENE HD Transfektionsreagenz gemischt, auf 100 µl mit RPMI Medium ohne Zusätze aufgefüllt und 15 min bei RT inkubiert. Hierbei bildete sich ein Komplex aus DNA und Lipiden, welcher über Endozytose von den Zellen aufgenommen wurde, so dass die Fremd-DNA ins Zytoplasma der Zellen gelangen konnte. Das Gemisch wurde tropfenweise zu den Zellen gegeben, die Platte geschwenkt und bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach 48 Stunden wurde das Medium vorsichtig abgenommen und 5 min bei 2.000 g und 4 °C zentrifugiert, um mögliche Zellbruchstücke zu entfernen. Der Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführt und bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. In die Wells wurde 1 ml Medium mit Zusätzen gegeben und die Zellen für weiter 24 h inkubiert. Danach wurde das Medium wiederum abgenommen und zentrifugiert wie am Tag zuvor.

Mittels SDS-PAGE (3.3.4) und Western Blot (3.3.6) wurde der Kulturüberstand auf das Vorhandensein von scFv-Fc Antikörperfragmenten untersucht. Die Transfektionseffizienz der Zellen wurde im Durchflusszytometer überprüft. Da auf dem verwendeten pMS2 Plasmid das Reptortergen für ein Green Fluoreszenz Protein (GFP) kodiert ist, produzierten die Zellen, die das Plasmid aufgenommen hatten, zusätzlich zum Antikörperfragment auch ein GFP und waren dadurch grün markiert. Die Zellen wurden aus dem Well der Platte abgenommen und ein Teil für die Durchflusszytometrie verwendet. Hierfür wurden zu den Zellen 1 ml FACS Waschpuffer (PBS; 0,2 % BSA; 0,1 % NaN_3) gegeben und die Zellen 5 min bei 2.000 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 500 µl 1 % Paraformaldehyd aufgenommen und das grüne Fluoreszenzsignal im Guava EasyCyte 5HT gemessen. Die restlichen Zellen wurden unter Selektionsdruck durch ein Antibiotikum kultiviert, um so stabil transfizierte Zellen zu erhalten. Hierzu wurde dem Kulturmedium 100 µg/ml Zeocin zugesetzt. Die Zeocinresistenz des pMS2 Vektors ermöglichte den transfizierten Zellen ein Wachstum trotz Antibiotikum. Nach 12 - 14 Tagen in Kultur unter Antibiotikum wurden die Zellen erneut im Durchflusszytometer untersucht. Bei mindesten 90 % GFP-positiven Zellen wurden die Zellen entweder wie unter 3.1.2 beschrieben eingefroren oder für die weitere Produktion von scFv-Fc Antikörperfragmenten in Medium mit Zeocin kultiviert. Der Antikörper enthaltende Überstand wurde hierbei alle 5 - 7 Tage abgenommen, von Zellbruchstücken befreit und bei 4 °C gelagert.

3.1.5 Herstellung von Membranfragmenten

Die Herstellung von Membranfragmenten (MF) ermöglicht die Isolation von biologisch aktiven Membranantigenen [110]. Die Membranantigene dienen der ELISA-basierten Bindungsanalyse der selektierten Antikörperfragmente. Sie wurden im polyklonalen Phagen-ELISA (3.4.4) zur Überprüfung der Anreicherung SCLC-spezifischer Antikörper und im monoklonalen ELISA (3.4.5 & 3.5.2) zur Untersuchung der Bindeaktivität einzelner Antikörperklone eingesetzt. Für die Herstellung wurden 1×10^7 Zellen (NCI-H69, NCI-H82, DMS273 oder PBMC's) für 5 min bei 200 g und 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml PBS aufgenommen und erneut unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde zwei Mal wiederholt, bevor das Zellpellet in 5 ml eiskaltem Homogenisierungspuffer aufgenommen wurde. Die Zellsuspension wurde anschließend auf Eis 15 x 1 sec bei 30 %iger Intensität sonifiziert, wobei dazwischen 0,5 sec pausiert wurde. Dann wurde die Suspension 12 min bei 1.000 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein Ultrazentrifugenröhrchen überführt. Im Anschluss wurde mit Hilfe einer Ultrazentrifuge 20 min bei 100.000 g und 4 °C zentrifugiert und das Membranpellet in 10 ml Resuspendierungspuffer aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation bei gleichen Bedingungen, wurde das Membranpellet in 1,2 ml PBS aufgenommen und in Aliquots zu je 200 µl bei -80 °C gelagert.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) lassen sich DNA-Abschnitte gezielt amplifizieren. In dieser Arbeit wurde die PCR für vier Anwendungen eingesetzt:

1. Zum Nachweis des Vorhandenseins eines DNA-Fragments in einem Plasmid
2. Zur Amplifikation eines DNA-Fragments für die anschließende Sequenzanalyse
3. Zur zielgerichteten Mutation einer Base innerhalb eines DNA-Fragments
4. Zur Anlagerung von Restriktionsschnittstellen an DNA-Fragmente

Das DNA-Fragment wurde hierfür entweder aus einem aufgereinigten Plasmid oder direkt aus einer Plasmid-enthaltenden Bakterienkolonie wie in Tabelle 5 amplifiziert.

Tabelle 5: PCR-Ansatz und Programm

PCR-Ansatz		PCR-Programm		Zykluszahl
10 x PCR Puffer	5 µl	initiale Denaturierung	10 min, 95 °C	1
MgCl ₂	3 µl (1,5 mM)	Denaturierung	30 sec, 95 °C	30
3' Primer	1 µl (10 pmol)	Annealing	30 sec, 55 °C	
5' Primer	1 µl (10 pmol)	Elongation	90 - 120 sec, 72 °C	
dNTP Mix	0,5 µl (200 µM)	Finale Elongation	10 min, 72 °C	1
<i>Taq</i> Polymerase	0,25 µl (1,25 U)	Kühlung	∞, 4 °C	1
Template	1 µl Plasmid bzw. Bakterienkol.			
ddH ₂ O	38,25 µl			

Die Reagenzien wurden zunächst als Mastermix ohne Zusatz des Templates gemischt und auf PCR-Gefäße verteilt. Nach Zugabe des entsprechenden Templates erfolgte die DNA Amplifikation. Die Länge der Elongationszeit richtete sich nach der Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragments. Hierbei wurde davon ausgegangen, dass die *Taq* Polymerase laut Hersteller 500 Basen pro 30 sec amplifiziert. Bei jeder PCR wurden auch immer eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt. Für die Positivkontrolle wurde DNA eines bereits analysierten Plasmid mit verifiziertem Insert verwendet, während für die Negativkontrolle ddH₂O eingesetzt wurde. Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe einer Agarose-Gelelektrophorese (3.2.2) kontrolliert. Wenn erforderlich wurden die PCR-Produkte anschließend mit dem PCR Purification Kit von Qiagen gemäß Herstellerangaben aufgereinigt.

3.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse von DNA-Fragmenten nach PCR oder Restriktionsverdau wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Hierbei werden in einem Agarosegel die DNA-Fragmente durch Anlegen einer Spannung ihrer Größe nach getrennt. Die DNA wird dabei durch Ethidiumbromid, welches mit der DNA interkaliert, unter UV-Licht sichtbar gemacht.

Zur Kontrolle einer PCR wurde eine analytische Gelelektrophorese durchgeführt. Hierfür wurde 1,5 % (w/v) Agarose in 1 x TAE Puffer unter Erwärmen in einer Mikrowelle gelöst und nach Zugabe von 5 µl 1 % Ethidiumbromidlösung in einen Schlitten gegossen. Das erstarrte Gel wurde in eine Kammer mit 1 x TAE Puffer gegeben, die PCR-Proben sowie ein Molekulargewichtsmarker mit 6 x Ladepuffer gemischt und damit das Gel beladen. Der Ladepuffer beschwert die DNA-Proben und zeigt die Lauffront des Gels an. Durch Anlegen einer Spannung von 135 V für 30 min wurden die DNA-Fragmente ihrer Größe nach getrennt und die Banden unter UV-Licht in einer Geldokumentationsstation analysiert.

Sollten gewünschte DNA-Fragmente nach einem Restriktionsverdau von restlicher DNA getrennt werden, wurde eine präparative Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Hierbei wurde das gewünschte DNA-Fragment nach Größentrennung mit einem Skalpell zügig unter UV-Licht

ausgeschnitten und mit Hilfe des JetQuick Gel Extraktionskits laut Herstellerangaben aufgereinigt. Bis zum weiteren Einsatz wurde die extrahierte DNA bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.2.3 Bestimmung des Nukleinsäuregehalts und der Reinheit

Die Konzentration und Reinheit von DNA-Proben wurde photometrisch bestimmt. Hierbei wurde mit Hilfe eines NanoDrop Photometers die optische Dichte bei 260 nm bestimmt. Zusätzlich wurde durch das Verhältnis der Messwerte von 260/280 nm der Reinheitsgrad ermittelt. Das Verhältnis sollte im Idealfall zwischen 1,8 und 2,0 liegen, was für eine proteinfreie Nukleinsäurelösung spricht [111].

3.2.4 Sequenzierung

Durch eine Sequenzierung kann die genaue Basenabfolge eines DNA-Fragments untersucht werden. Hierdurch wurden die DNA-Sequenzen der Antikörperfragmente nach Selektion und Klonierung in die verschiedenen Vektoren analysiert. Die Sequenzierung erfolgte über die Didesoxymethode oder auch Kettenabbruch-Synthese nach Sanger [112]. Hierbei wird ein einzelsträngiges DNA-Fragment durch eine DNA-Polymerase amplifiziert, wobei unterschiedlich Fluoreszenz-markierte Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTP's) verwendet werden. Diese ddNTP's besitzen keine 3'-Hydroxygruppe, so dass nach Einbau keine weitere Base durch die Polymerase angelagert werden kann und es somit zum Abbruch der Synthese kommt. Es entstehen unterschiedlich lange Fragmentstücke, die mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt werden. Durch einen Laser werden die markierten ddNTP's zur Fluoreszenz angeregt, so dass auf Grund des unterschiedlichen Fluoreszenzsignals der entsprechenden ddNTP's die Sequenz des DNA-Fragments abgelesen werden kann.

Für die Sequenzierungsreaktion wurde entweder ein aufgereinigtes PCR-Produkt oder Plasmid verwendet. Zunächst wurde mit Hilfe einer Sequenzierungs-PCR von dem PCR-Produkt bzw. Plasmid einzelsträngige DNA amplifiziert. Tabelle 6 zeigt den PCR-Ansatz und das PCR-Programm der Sequenzierungs-PCR.

Tabelle 6: Sequenzierungs-PCR

PCR-Ansatz		PCR-Programm		Zyklenzahl
Big Dye Puffer	2 μl	initiale Denaturierung	60 sec, $96\text{ }^{\circ}\text{C}$	1
Big Dye Mix	1 μl	Denaturierung	10 sec, $96\text{ }^{\circ}\text{C}$	25
3'- bzw. 5' Primer	1,5 μl (15 pmol)	Annealing	5 sec, $50\text{ }^{\circ}\text{C}$	
Template	1 μl PCR-Produkt bzw. Plamid	Elongation	75 sec, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$	
ddH ₂ O	4,5 μl	Kühlung	∞ , $4\text{ }^{\circ}\text{C}$	1

Danach wurde das PCR-Produkt mit dem DyEx 2.0 Spin Kit von Qiagen laut Herstellerangaben aufgereinigt. 10 μl des aufgereinigten Produkts wurden mit 10 μl Hi-Di Formamid gemischt und anschließend sequenziert.

3.2.5 Plasmidpräparation

Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte durch alkalische Lyse [113] unter Verwendung des Plasmid Mini Kits oder des QIAprep Spin Miniprep Kits von Qiagen nach Herstellerangaben. Hierfür wurde entweder eine Bakterienkolonie von einer Agaroseplatte gepickt oder eine geringe Menge eines Bakterienglycerolstocks abgekratzt und zu 5 ml 2xYT-Medium mit Antibiotikum (je nach Plasmid entweder 100 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin) gegeben. Die Bakterienkultur wurde für 12 - 16 h bei 37 °C und 250 rpm in einen Inkubationsschüttler kultiviert, bevor die Präparation durchgeführt wurde. Die Lagerung der aufgereinigten Plasmide erfolgte bei -20 °C. Die Messung des DNA-Gehalts wurde wie unter 3.2.3 beschrieben durchgeführt.

3.2.6 Restriktionsverdau und Klonierung von DNA-Fragmenten

Durch einen Restriktionsverdau wird DNA an definierten Stellen geschnitten. Hierfür werden Restriktionsenzyme verwendet, die bestimmte DNA-Sequenzen erkennen und diese verdauen. DNA-Fragmente lassen sich auf diese Weise aus Plasmiden rausschneiden und in andere Vektoren einsetzen. In dieser Arbeit wurden hierdurch Antikörperfragmente umkloniert. Tabelle 7 gibt eine Übersicht über die durchgeführten Restriktionsverdaus.

Tabelle 7: Übersicht der Restriktionsverdaus

Vektor bzw. DNA-Fragmente	Restriktionsenzyme	Produkte	
		Insert [bp]	Vektor [bp]
pIT2	<i>SfiI</i> – <i>NotI</i>	733 (scFv)	4500
pMT2	<i>SfiI</i> – <i>NotI</i>	733 (scFv)	6037
	<i>SfiI</i> – <i>AscI</i>	1421 (Fab)	5340
pMT2-ETA'	<i>SfiI</i> – <i>NotI</i>	733 (scFv)	6529
pMS2	<i>SfiI</i> – <i>NotI</i>	733 (scFv)	7488
pGAL	<i>XhoI</i> – <i>HindIII</i>	357 (V _H)	4397
	<i>SacI</i> – <i>XbaI</i>	323 (V _L)	4431
	<i>SfiI</i> – <i>AscI</i>	1421 (Fab)	3333
scFv	<i>SfiI</i> – <i>NotI</i>	733	
V _H -Kette	<i>XhoI</i> – <i>HindIII</i>	357	
V _L -Kette	<i>SacI</i> – <i>XbaI</i>	323	

Für jeden Restriktionsverdau wurde 1 µg Plasmid eingesetzt. Der Verdau erfolgte für 1 h im Heizblock, wobei die Temperatur abhängig vom jeweiligen Enzym gewählt wurde. Befand sich das Temperaturoptimum beider Enzyme bei der gleichen Temperatur wurde ein Doppelverdau mit beiden Enzymen zusammen durchgeführt. Die Plasmide wurden nach der Restriktion zusätzlich mit antarktischer Phosphatase für 1 h bei 37 °C dephosphoryliert, wodurch die Phosphatgruppe am 5'-Ende der DNA entfernt wurde. Da für eine Ligation jedoch die 5'-Phosphatgruppe notwendig ist,

wurde ein Religieren des Plasmids verhindert und somit der Vektorhintergrund minimiert [114]. Das Insert besaß dagegen noch die 5'-Phosphatgruppe und konnte in das Plasmid eingebaut werden. Im Anschluss wurden die Restriktionsenzyme und die antarktische Phosphatase hitzeinaktiviert, bevor die DNA auf einem Agarosegel der Größe nach getrennt und das gewünschte Fragment (Vektor oder Insert) aus dem Gel extrahiert wurde (3.2.2). Die Temperatur für die Hitzeinaktivierung wurde anhand des entsprechenden Enzyms gewählt. Daran anschließend wurde der DNA-Gehalt gemessen und das Verhältnis für die anschließende Ligation berechnet:

$$\frac{\text{Größe des Insert [bp]}}{\text{Größe des Vektors [bp]}} \times \text{Menge an Vektor [ng]} = \text{benötigte Menge an Insert [ng]}$$

Für die Ligation wurde 50 ng Vektor eingesetzt. Da das Vektor/Insert-Verhältnis 1:10 betrug, also Insert in 10-fachem Überschuss eingesetzt wurde, wurde die benötigte Menge an Insert noch mit 10 multipliziert. Zunächst wurden Vektor und Insert in ddH₂O gemischt und für 10 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von Ligasepuffer und T4-Ligase wurde für 1 h bei Raumtemperatur (RT) ligiert. Zum Schluss wurde die T4-Ligase für 10 min bei 65 °C hitzeinaktiviert, bevor das Plasmid in kompetente Bakterien transformiert werden konnte.

3.2.7 Hitzeschocktransformation von *E. coli*

Zur Amplifikation von Plasmid-DNA und zur prokaryotischen Expression von Antikörperfragmenten wurden die jeweiligen Plasmide über eine Hitzeschocktransformation in Bakterien eingebracht. Die Hitzeschocktransformation ermöglicht unter Verwendung von kompetenten Bakterien das Einbringen von Fremd-DNA in die Bakterien. Hierbei werden die Bakterien einem kurzen Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt, wodurch die Membran kurz durchlässig wird und die Fremd-DNA in die Bakterien gelangen kann.

Die kompetenten Bakterien XL1-Blue wurden nach einer Klonierung für die Amplifikation der Plasmide verwendet. Hierfür wurden 50 µl Bakterien auf Eis aufgetaut und nach Zugabe von 0,9 µl Mercaptoethanol für 10 min auf Eis inkubiert. Dann wurden 5 ng Plasmid zugegeben und weitere 30 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden für 45 sec in ein 42 °C warmes Wasserbad gegeben und anschließend für 2 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 950 µl SOC Medium wurden die Bakterien 1 h bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Nach Zentrifugation für 5 min bei 800 g konnte das Bakterienpellet in 100 µl 2xYT Medium aufgenommen und einmal unverdünnt, sowie 1:10 verdünnt auf Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum (100 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin) ausplattiert werden. Die anschließende Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C.

Für die Expression von löslichen scFv-Fc Antikörpern, Fab-Fragmenten und rekombinanten Immuntoxinen wurde der Bakterienstamm BL21(DE3) verwendet. Dieser enthält das Gen zur Produktion der T7-RNA-Polymerase, die die Verwendung des im Plasmid enthaltenen T7-Promotors und dadurch eine hohe Expression der Antikörper ermöglicht. Für die Hitzeschocktransformation wurden 50 µl der Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 5 ng Plasmid gemischt. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis wurden die Bakterien für 10 sec in ein 42 °C warmes Wasserbad gegeben und anschließend für 5 min auf Eis gestellt. Dann wurden 950 µl SOC Medium zugegeben und die Bakterien für 1 h bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Im Anschluss wurden die Bakterien 5 min bei 800 g zentrifugiert, bevor das Pellet in 100 µl 2xYT aufgenommen wurde. Die Bakterien wurden unverdünnt und 1:10 verdünnt auf Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Zur Kontrolle des Inserts und der korrekten Aufnahme des Plasmids durch die Bakterien wurde eine Kolonie-PCR (3.2.1) durchgeführt und das amplifizierte DNA-Fragment anschließend sequenziert (3.2.4). Bei erfolgreicher Aufnahme wurde von dem analysierten Klon eine Übernachtskultur erstellt. Hierfür wurde der gepickte Klon der Agarplatte zu 5 ml 2xYT mit entsprechendem Antibiotikum gegeben und über Nacht schüttelnd bei 37 °C, 250 rpm inkubiert. Von dieser Übernachtskultur wurde am nächsten Morgen ein Glycerolstock angelegt. 425 µl der Kultur wurden mit 75 µl sterilem Glycerol gemischt und bei -80 °C gelagert. Von der restlichen Übernachtskultur wurde eine Plasmidpräparation, wie in Kapitel 3.2.5 beschrieben, durchgeführt.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Prokaryotische Antikörperexpression

Zur Analyse der Bindeaktivität und des zytotoxischen Potentials wurden durch eine prokaryotische Expression lösliche Antikörperfragmente hergestellt. Die Expression erfolgte hierbei nach zwei verschiedenen Verfahren. Für die Herstellung von Fab-Fragmenten und scFv-Fc Fusionsproteinen wurde eine konventionelle Expression durchgeführt, während die rekombinanten Immuntoxine unter Stressbedingungen nach Barth *et al.* [115] hergestellt wurden.

Für die Expression der Fab-Fragmente bzw. scFv-Fc's wurde aus einem Glycerolstock eine Vorkultur in 50 ml 2xYT Medium mit 50 µg/ml Kanamycin, 1 % Glucose angelegt und bei 37 °C, 220 rpm über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 500 ml 2xYT Medium, 50 µg/ml Kanamycin, 0,1 % Glucose mit der über Nacht Kultur auf eine OD_{600nm} von 0,09 inokuliert und wie zuvor bis zu einer $OD_{600nm} = 0,6 - 0,8$ kultiviert. Dann wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Das Lactose-Analogon IPTG inhibiert den lac-Repressor, wodurch der lac-Operator nicht mehr blockiert wird und das Antikörpergen transkribiert werden kann. Nach Zugabe des IPTG wurden

die Bakterien für eine weitere Stunde, jedoch bei 30 °C, inkubiert. Die niedrigere Temperatur verbessert die Faltung der Fab-Fragmente im Periplasma der Bakterien [116]. Anschließend wurden die Bakterien 15 min bei 4.000 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Um einen Abbau der Antikörperfragmente durch Proteasen zu verhindern, wurden alle weiteren Schritte auf Eis durchgeführt. Das Bakterienpellet wurde in 10 ml Lysepuffer aufgenommen und 30 min inkubiert. Dann wurde das Bakterienlysate 4 x 4 sec mit einem Ultraschallstab bei 15 % Intensität sonifiziert und die Suspension 15 min bei 10.000 g, 4 °C zentrifugiert. Der Protein-enhaltende Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführt und der pH-Wert für die anschließende Aufreinigung (3.3.2) auf 7,4 eingestellt.

Bei der Stressexpression der scFv-ETA'-Konstrukte wurden die Immuntoxine unter osmotischem und hypothermischem Stress exprimiert, um so große Mengen korrekt gefalteter rekombinanter IT's zu erhalten. Hierfür wurde eine Vorkultur in 50 ml TB Medium mit 0,5 mM ZnCl₂, 1 ml 50-fach Phosphatpuffer, 50 µg/ml Kanamycin angelegt und über Nacht bei 28 °C, 220 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Hauptkultur, bestehend aus 250 ml TB Medium, 0,5 mM ZnCl₂, 5 ml 50-fach Phosphatpuffer und 50 µg/ml Kanamycin, mit der Übernachtskultur auf eine OD_{600nm} von 0,09 inokuliert und bei 26 °C, 220 rpm bis zu einer OD_{600nm} von 1,6 inkubiert. Dann folgte die Zugabe von 0,5 M Sorbitol, 4 % (w/v) NaCl, 10 mM Betain, sowie 50 ml TB Medium mit 0,5 mM ZnCl₂, 1 ml 50-fach Phosphatpuffer, 50 µg/ml Kanamycin. Die Kultur wurde weitere 30 min inkubiert. Im Anschluss wurde durch Zugabe von 2 mM IPTG die Proteinexpression für 16 h induziert. Danach wurden die Bakterien 15 min bei 4.000 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Lyse der Bakterien erfolgte wie bei der konventionellen Expression.

3.3.2 Aufreinigung der Antikörperfragmente mittels Immobilisierter Metallchelat Affinitätschromatographie (IMAC)

An allen in dieser Arbeit hergestellten Antikörperfragmenten (scFv-Fc, Fab, scFv-ETA') befand sich ein His₆ bzw. His₁₀ tag. Je nachdem über welchen Vektor das Fragment hergestellt wurde, war das His tag N- oder C-terminal an das Fragment fusioniert (2.8). Das poly-His tag ermöglicht die Aufreinigung der Antikörper über eine Affinitätschromatographie durch Bindung an immobilisierte Nickel-Nitrilotriessigsäure („nickel-nitrilotriacetic acid“, Ni-NTA) [117]. Bei Nitrilotriessigsäure handelt es sich um einen Komplexbildner, der stabile Komplexe mit Metallionen wie Ni²⁺ eingeht. An diesen Ni-NTA Komplex binden die freien Elektronen der Imidazolringe der Histidine mit hoher Affinität, so dass die Antikörperfragmente von anderen Bestandteilen getrennt werden können. Die optimale Bindung erfolgt bei einem pH-Wert von 7,4. Durch freies Imidazol können die Antikörper wieder vom Komplex eluiert werden.

Für die Aufreinigung wurde entweder Bakterienlysat oder Kulturüberstand von transfizierten HEK Zellen verwendet. Die Aufreinigung erfolgte mit den Ni-NTA Superflow Säulen von Qiagen. Zunächst wurde die Säule mit 10 ml Equilibrierungspuffer equilibriert. Dann wurden 10 ml Lysat bzw. Kulturüberstand durch die Säule gedrückt und anschließend mit 10 ml Waschpuffer gereinigt. Durch Zugabe von 10 ml Elutionspuffer wurden die Antikörperfragmente von der Säule gelöst und in einem 15 ml Röhrchen aufgefangen. Die eluierten Antikörperfragmente wurden vor Verwendung eingeengt und in PBS umgepuffert (3.3.3). Die Säulen wurden daraufhin für die nächste Aufreinigung regeneriert. Hierfür wurden die Säulen zunächst mit 15 ml 0,5 M NaOH gewaschen. Danach wurden die Säulen mit 10 ml Equilibrierungspuffer re-equilibriert und vor der Lagerung 5 ml 20 % Ethanol durch die Säule gedrückt. Alle Flüssigkeiten wurden mit einer Flussrate von 1 ml/min durch die Säule gedrückt. Eine Ausnahme hiervon bildete das NaOH, welches mit einer Flussrate von 0,5 ml/min durch die Säule gedrückt wurde. Die Lagerung der aufgereinigten Antikörperfragmente erfolgte bei 4 °C.

3.3.3 Einengen und Umpuffern der Antikörperfragmente

Zur Aufkonzentration und zum Umpuffern der aufgereinigten Antikörperfragmente wurden diese mit Hilfe der Vivaspin Turbo 15 Zentrifugalkonzentratoren eingeengt. Diese Konzentratoren enthalten eine Doppelmembran mit einer Trenngrenze von 30 kDa wodurch die Antikörperfragmente von der Membran zurückgehalten und niedermolekulare Bestandteile entfernt werden.

Hierfür wurden 10 ml Antikörperlösung auf die Säule gegeben und bei 4.000 g und 4 °C zentrifugiert, bis das Volumen, das von der Membran zurückgehalten wurde, nur noch ca. 1 ml betrug. Anschließend wurde die Antikörperlösung in PBS umgepuffert. Dafür wurden 5 ml steril filtriertes PBS zu der verbliebenen Antikörperlösung gegeben und erneut auf 1 ml eingeengt. Dieser Vorgang wurde zwei Mal wiederholt.

3.3.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Durch eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) lassen sich Proteine in einem elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht auftrennen [118]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden hierdurch die verschiedenen Antikörperfragmente für eine anschließende Coomassie-Färbung (3.3.5) oder einen Western Blot (3.3.6) der Größe nach getrennt. Das SDS bindet hierbei an die Proteine und sorgt so für eine konstante, negative Ladung; das Polyacrylamid dient als Trennmedium. Durch das vorherige Denaturieren der Proben werden die Proteine linearisiert, wodurch die Auftrennung nach der Größe ermöglicht wird.

Für die Elektrophorese wurden NuPAGE 4 - 12 % Bis-Tris Gradientengele verwendet. Zunächst wurden die Proben im Verhältnis von 1:1 mit 2-fach Sample Puffer gemischt und für 10 min bei 70 °C denaturiert. Dann wurden die Proben in die Taschen des Gels, welches zuvor in eine Elektrophoresekammer gefüllt mit Laufpuffer geklemmt wurde, pipettiert und 60 min bei 200 V laufen gelassen. Durch Verwendung von definierten Molekulargewichtsmarkern konnte die Proteingröße in der anschließenden Coomassie-Färbung oder dem Western Blot bestimmt werden.

3.3.5 Coomassie-Färbung

Mit Hilfe einer Coomassie-Färbung wurde die Herstellung und Aufreinigung der Antikörperfragmente überprüft. Coomassie-Brilliant-Blau lagert sich an die basischen Seitenketten von Proteinen an, wodurch diese angefärbt werden. Hierdurch können Proteinbanden in einem Polyacrylamid-Gel sichtbar gemacht werden [119].

Die Polyacrylamid-Gele wurden hierfür für 30 min unter Schütteln in eine Lösung bestehend aus 40 % Methanol, 10 % Eisessig, 50 % VE-Wasser und 0,25 % Coomassie-Brilliant-Blau G250 gelegt. Anschließend wurden die Gele für mehrere Stunden in VE-Wasser entfärbt, bis nur noch die Proteinbanden zu sehen waren. Hierbei wurde das Wasser mehrmals gewechselt. Zur Dokumentation wurden die entfärbten Gele eingescannt.

3.3.6 Western Blot

Durch einen Immunoblot (Western Blot) lassen sich mit Hilfe von Antikörpern Proteine detektieren. Hierdurch wurden die hergestellten Antikörperfragmente spezifisch nachgewiesen. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Fragmente in der SDS-PAGE (3.3.4) wurden diese auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran übertragen. Hierfür wurde die Membran auf das Gel gelegt und die Proteinbanden in der Blotkammer durch Anlegen einer Spannung von 300 V für 20 min übertragen. Die Übertragung der Proteine wurde durch eine Ponceau-Färbung überprüft [120]. Bei Ponceau handelt es sich um einen Azofarbstoff, der reversibel an positiv geladene Aminogruppen der Proteine bindet. Hierfür wurde die Membran für 2 min in eine Ponceau-Lösung gelegt, so dass die Proteinbanden rot angefärbt wurden. Bei erfolgreicher Übertragung der Proteine wurde die Membran zum Entfärben mehrfach in TBST-Puffer unter Schütteln gewaschen und dann zum Blockieren der freien Bindungsstellen 1 h bei RT in Blocking-Solution gelegt. Die Detektion der Antikörperfragmente erfolgte entweder direkt über einen HRP-gekoppelten Antikörper (anti-mouse HRP bei scFv-Fc oder anti-Fab HRP bei Fab-Fragmenten) oder indirekt über einen unkonjugierten Erstantikörper (TC-1 bei scFv-ETA') gefolgt von einem HRP-gekoppelten Zweitantikörper. Die Antikörper wurden in 10 ml Blocking-Solution verdünnt und 1 h auf einem Rotator bei RT inkubiert.

Zwischen dem Erst- und Zweitantikörper wurde die Membran drei Mal 5 min in TBST gewaschen, um die nicht gebundenen Erstantikörper zu entfernen. Vor dem Entwickeln wurde die Membran 5 x 5 min in TBST gewaschen, bevor das Chemilumineszenz-Detektionsreagenz ECL Prime zugegeben wurde. Die Entwicklung erfolgte in einer Dunkelkammer durch Auflegen eines Röntgenfilms auf die Membran. Der Röntgenfilm wurde je nach Signalstärke für 5 - 60 sec aufgelegt. Anschließend wurde der Röntgenfilm kurz in Entwicklungslösung, dann in Fixierungslösung und zum Schluss in Wasser gelegt. Zur Dokumentation wurden die Röntgenfilme eingescannt.

3.3.7 Kolorimetrische und photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration der aufgereinigten Antikörperfragmente wurde auf zwei Arten bestimmt, kolorimetrisch und photometrisch. Beim kolorimetrischen Verfahren wurden die Antikörperfragmente nach Aufreinigung in einem Polyacrylamid-Gel der Größe nach getrennt (3.3.4) und anschließend durch Coomassie angefärbt (3.3.5). Zusätzlich wurde ein BSA-Standard (0,125 - 2 µg) zur Erstellung einer Standardgeraden aufgetragen. Mit Hilfe der GelAnalyzer 2010 Software wurden die Antikörperbanden visuell mit dem BSA-Standard verglichen und die Konzentration berechnet. Beim photometrischen Verfahren wurde die Antikörperkonzentration mit Hilfe eines BCA-Assays bestimmt. Das Verfahren beruht auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ durch die Peptidbindungen der Proteine [121]. Die Menge an reduziertem Cu^{2+} ist hierbei proportional zum Proteingehalt. Die entstandenen Cu^+ Ionen bilden daraufhin einen Chelatkomplex mit Bicinchoninsäure („*bicinchoninic acid*“, BCA), wodurch es zu einer violetten Färbung kommt, dessen Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen werden kann. Wie schon beim ersten Verfahren diente ein BSA-Standard zur Erstellung einer Standardgeraden, mit der die Proteinkonzentration berechnet werden konnte. Der BCA-Assay wurde mit dem Pierce BCA-Assay Kit laut Herstellerangaben durchgeführt. Die Messung der Absorption erfolgte am NanoDrop Photometer.

3.4 Phage Display

Für die Generierung spezifischer Antikörperfragmente wurden die naiven, humanen Antikörperbibliotheken Tomlinson I und J vom Medical Research Council aus Cambridge (England) verwendet. Zur Vermeidung von Phagen-Kontaminationen wurden alle Phagenarbeiten unter einer separaten Werkbank durchgeführt.

3.4.1 Produktion scFv-präsentierender Phagen

Die Phagemid-enthaltenden *E. coli* TG1 Bakterien der Tomlinson Antikörperbibliotheken wurden in 500 µl Aliquots bei -80 °C gelagert. Hiervon wurde für die Produktion scFv-präsentierender Phagen ein Aliquot zu 200 ml 2xYT_{Amp/Gluc} Medium (100 µg/ml Ampicillin, 1 % Glucose) gegeben und über Nacht bei 37 °C, 220 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden 10 ml 2xYT_{Amp/Gluc} Medium mit der Vorkultur auf eine Start OD_{600nm} von 0,09 inokuliert und bis zu einer OD_{600nm} von 0,4 - 0,5 kultiviert. Bei dieser OD befinden sich die Bakterien in der logarithmischen Wachstumsphase und bilden den F-Pilus aus, über den die anschließende Infektion mit Phagen stattfindet. Von dieser Kultur wurden 5 ml mit Phagen in einer „multiplicity of infection“ (MOI) von 20 infiziert. Hierbei wurde in der ersten Selektionsrunde der M13K07ΔpIII Hyperphage verwendet, wodurch es zu einer polyvalenten Darstellung der scFv's kommt [52]. In der 2. und 3. Selektionsrunde wurden die Bakterien für eine monovalente scFv-Darstellung mit M13K07 Helferphagen infiziert. Die Infektion erfolgte zunächst stationär 30 min bei 37 °C und danach schüttelnd ebenfalls für 30 min bei 37 °C. Zur Kontrolle der Infektion wurden 50 µl der Kultur auf eine 2xYT-Agarplatte mit 100 µg/ml Ampicillin und 50 µg/ml Kanamycin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Auf dieser Platte konnten nur Bakterien wachsen, die sowohl das Phagemid enthielten, als auch von Phagen infiziert wurden, da sich die Ampicillinresistenz auf dem Phagemid befand, während die Kanamycinresistenz von den Phagen stammte. Ein konfluenten Bewuchs der Platte zeigte eine erfolgreiche Infektion an. Die verbliebenen 4,95 ml Kultur wurden 5 min bei 4.500 g und 4 °C zentrifugiert, das Pellet in 25 ml 2xYT_{Amp/Kan/IPTG} aufgenommen und zur Produktion von scFv-präsentierenden Phagen für 18 - 20 h bei 30 °C, 250 rpm kultiviert. Das IPTG ermöglichte die Transkription des scFv-pIII Fusionsproteins, welches bei der Produktion neuer Phagenpartikel eingebaut werden sollte. Im Anschluss wurde die Bakterienkultur bei 4 °C und 4.500 g für 30 min zentrifugiert und der Phagen-enthaltende Überstand in ein neues Röhrchen überführt. Zur Fällung der Phagen („Phage-Rescue“) wurden zum Überstand 5 ml einer eiskalten PEG/NaCl-Lösung (20 % Polyethylenglycol 6.000, 2,5 M NaCl) zugegeben und 60 min unter mehrmaligem Schütteln auf Eis inkubiert. Da Phagen sehr plastikaffin sind, banden die Phagenpartikel an das PEG und konnten im Folgeschritt pelletiert werden. Hierfür wurde die Suspension für 30 min bei 15.000 g und 4 °C zentrifugiert. Das Phagenpellet wurde in 220 µl PBS aufgenommen und nochmals bei 4 °C, 13.000 g für 2 min zentrifugiert, um eventuell vorhandene Bakterienbruchstücke zu entfernen. Der Phagen-enthaltende Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Gefäß überführt und der Input-Titer für die spätere Selektion bestimmt. Hierfür wurde aus der Phagensuspension eine Verdünnungsreihe (10⁻², 10⁻⁴, 10⁻⁶, 10⁻⁸) in 200 µl PBS erstellt und mit der vierfachen Menge an TG1's mit OD_{600nm} = 0,4 - 0,5 versetzt. Während einer 30 min stationären Inkubation und folgender 30 min Inkubation unter Schütteln, jeweils bei 37 °C, wurden die Bakterien mit Phagen infiziert. Nach der Inkubation wurden von jeder Verdünnungsstufe 10 µl auf eine

2xYT_{Amp/Gluc}-Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Durch Zählen der Kolonien auf den Verdünnungsplatten konnte der Phagentiter am Folgetag berechnet werden:

$$\frac{\text{Koloniezahl} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Verdünnungsstufe} \times \text{Volumen [ml]}} = \text{cfu/ml}$$

3.4.2 On Slide Selektion

Die Generierung SCLC spezifischer Antikörper erfolgte auf FFPE Lungengewebe von vier verschiedenen SCLC Patienten, welches für die Routinediagnostik entnommen wurde. Zur Abreicherung von scFv-Antikörperfragmenten gegen krankheitsirrelevante Antigene wurde die Bibliothek vor jeder Selektionsrunde auf FFPE Gewebe von unauffälligem Lungenmaterial depletiert. Für die Depletion und Selektion wurden von den Paraffin-eingebetteten Biopsaten mit Hilfe eines Mikrotoms 5 µm dicke Schnitte erstellt und auf Glasobjektträgern durch Adhäsionskräfte immobilisiert. Entscheidend für eine erfolgreiche Selektion ist die Zugänglichkeit der Antigenepitope [58]. Aus diesem Grund wurden in jeder Runde drei verschiedene Antigendemaskierungsverfahren durchgeführt. Ein weiterer Schnitt wurde nur entparaffiniert, da nicht bei jedem Antigen eine Demaskierung erforderlich ist. Bei zwei Verfahren handelte es sich um eine hitzeinduzierte Epitopfreilegung („*heat induced epitope retrieval*“, HIER) in Citrat- bzw. EDTA-Puffer und beim dritten Verfahren um eine proteolytische Epitopfreilegung („*proteolytic induced epitope retrieval*“, PIER). Für die Entparaffinierung der Schnitte wurden die Objektträger 10 min in Xylol gestellt und danach mehrfach in ein zweites Xylolbad getaucht. Dann wurden die Schnitte zum Rehydrieren in eine abnehmende Ethanolreihe (100 %, 96 %, 70 % Ethanol) getaucht, mit VE-Wasser gespült und anschließend in Tris-Puffer gestellt. Für die proteolytische Epitopfreilegung wurde das Gewebe mit Proteinase K bedeckt und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurde das Gewebe drei Mal in Tris-Puffer gespült. Bei der HIER wurden die Schnitte in Citrat-Puffer mit pH-Wert 6,0 bzw. EDTA-Puffer mit pH-Wert 9,0 gestellt und kurz in der Mikrowelle aufgeköcht. Danach wurden die Schnitte 2 x 7 min in der Mikrowelle erhitzt, bevor die Schnitte drei Mal mit Tris-Puffer gewaschen wurden. Vor Zugabe der Phagen wurde das Gewebe auf den Objektträgern mit einem Fettstift umkreist, um so ein Verlaufen der Phagensuspension zu vermeiden. Während der Antigendemaskierung wurde die Phagensuspension 1:1 in 4 % MPBS (Milchpulver in Phosphat-gepufferter Saline) verdünnt und 2 h auf einem Rotator geblockt. Die geblockte Phagensuspension wurde anschließend zur Depletion auf die vier gesunden Lungenschnitte pipettiert und für eine Stunde in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurden die nicht gebundenen Phagenpartikel vom gesunden Gewebe abgenommen und für die Selektion auf das entsprechend demaskierte SCLC Gewebe übertragen. Die Phagenpartikel

wurden erneut 1 h in einer feuchten Kammer inkubiert, bevor die Schnitte laut Waschprotokoll in Tabelle 8 gewaschen wurden. Hierbei wurde die Waschstringenz von Runde zu Runde erhöht, um so hoch affine Antikörper zu selektionieren.

Tabelle 8: Waschprotokoll der *On Slide* Selektion

1. Selektionsrunde	2. Selektionsrunde	3. Selektionsrunde
3x PBS kurz 2x PBS für je 5 min auf einem Schüttler bei RT	1x PBST kurz 4x PBST für je 5 min auf einem Schüttler bei RT	10x PBST kurz 5x PBST für je 5 min auf einem Schüttler bei RT
3x PBS kurz 2x PBS für je 5 min auf einem Schüttler bei RT	1x PBST kurz 4x PBST für je 5 min auf einem Schüttler bei RT	10x PBST kurz 5x PBST für je 5 min auf einem Schüttler bei RT

Nach dem Waschen wurden die spezifisch gebundenen Phagenpartikel von den Schnitten eluiert. Hierfür wurde auf jeden der vier Schnitte 100 µl 0,1 M Triethylamin (pH-Wert 12,2) pipettiert und 10 min inkubiert. Durch den basischen pH-Wert wurde die Bindung zwischen Antigen und Antikörper gelöst, so dass die Phagenpartikel abgenommen werden konnten. Die eluierten Phagenpartikel der vier Schnitte wurden gepoolt und mit 400 µl Tris-HCl (pH-Wert 7,5) neutralisiert. Zur Bestimmung des Output-Titers wurde aus dieser Phagensuspension, wie schon bei der Input-Titerbestimmung, eine Verdünnungsreihe erstellt und hierzu TG1's in logarithmischer Wachstumsphase gegeben. Die anschließende Titerbestimmung erfolgte wie in Kapitel 3.4.1 beschrieben. Die eluierten Phagen wurden mit 15 ml TG1's 30 min bei 37 °C stationär inkubiert. Parallel dazu wurde auf jeden SCLC Schnitt 100 µl der TG1's pipettiert und unter gleichen Bedingungen inkubiert, damit eventuell vorhandene, nicht-eluierte Phagenpartikel ebenfalls TG1's infizieren konnten. Im Anschluss wurden die Bakterien von den Schnitten abgenommen, der 15 ml Bakterienkultur zugeführt und 5 min bei 4.500 g zentrifugiert. Das infizierte Bakterienpellet wurde in 200 µl 2xYT-Medium aufgenommen und auf einer 15 cm 2xYT_{Amp/Gluc}-Agarplatte ausgestrichen. Die Platte wurde zusammen mit den Output-Titer-Platten über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die gewachsenen Kolonien der Output-Titer-Platten für die Titerbestimmung ausgezählt. Die Kolonien der 15 cm Agarplatte wurden mit 1,5 ml prokaryotischem Einfriermedium abgeschabt und bei -80 °C gelagert. Zuvor wurden hiervon 2 x 20 µl abgenommen und ebenfalls bei -80 °C gelagert. Eines dieser Aliquots diente als Ausgangsmaterial für die nächste Selektionsrunde, das zweite Aliquot wurde für den polyklonalen ELISA (3.4.3) verwendet, um eine Anreicherung SCLC-spezifischer Antikörper zu überprüfen. Insgesamt wurden zur Anreicherung von SCLC-spezifischen scFv's drei Selektionsrunden durchgeführt. Abb. 10 zeigt den schematischen Ablauf einer Selektionsrunde.

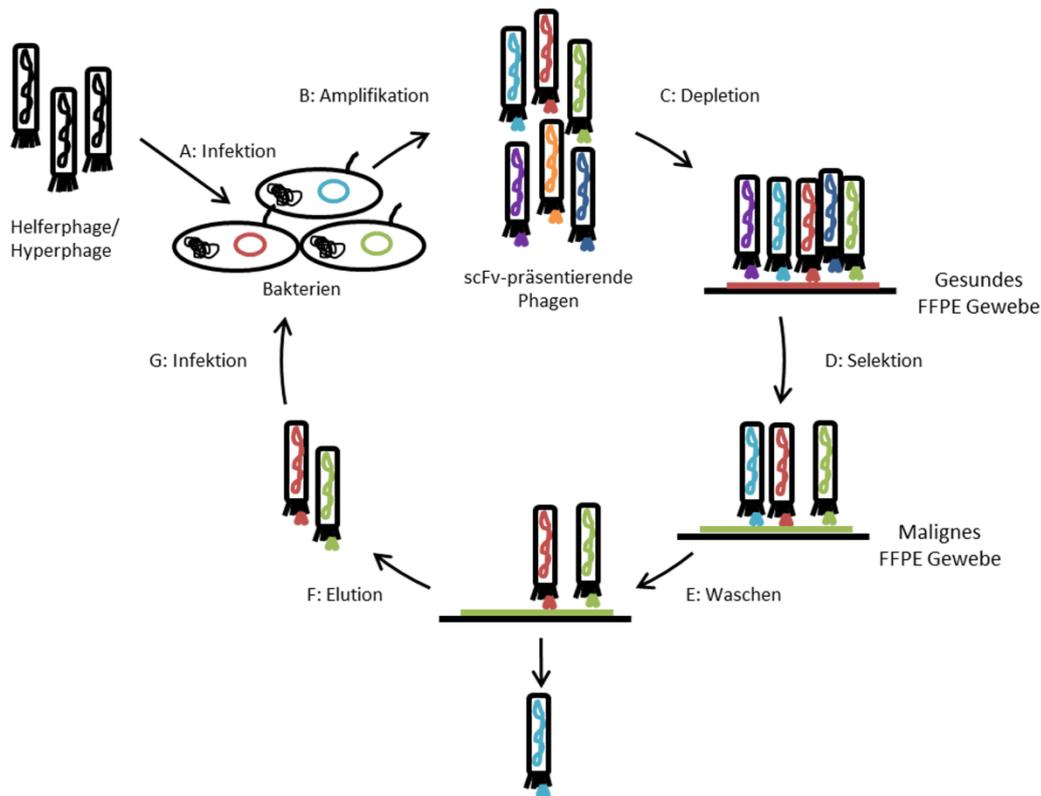


Abb. 10: Schematische Darstellung der On Slide Selektion

Die Phagemid-enthaltenden Bakterien wurden zunächst in logarithmischer Wachstumsphase mit Helfer- bzw. Hyperphagen infiziert (A) und dadurch scFv-präsentierende Phagen amplifiziert (B). Dann wurden die Phagenpartikel zur Depletion auf Objektträger mit gesundem Lungengewebe gegeben (C), um so Antikörperfragmente gegen krankheitsirrelevante Antigene abzureichern. Die nicht gebundenen Phagenpartikel wurden anschließend zur Selektion auf SCLC Gewebe pipettiert (D). Unspezifische und schwach gebundene scFv-Phagenpartikel wurden durch intensives Waschen entfernt (E) und anschließend die spezifischen Phagenpartikel vom Gewebe eluiert (F). Durch Infektion frischer Bakterien wurden die spezifischen scFv's gesichert (G) und dienten für die nächste Selektionsrunde als Ausgangsmaterial. Insgesamt wurden zur Anreicherung SCLC-spezifischer Antikörperfragmente drei Selektionsrunden durchgeführt.

3.4.3 Polyklonale Phagen-Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde die Anreicherung von SCLC-spezifischen scFv-Phagenpartikeln untersucht. Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Bestimmung der Größe und der Granularität von Zellen. Hierdurch können verschiedene Zellpopulationen und lebende von toten Zellen unterschieden werden. Durch die Verwendung von fluoreszenzgekoppelten Antikörpern können die Zellen zusätzlich markiert werden. Die Zellen passieren in einem Flüssigkeitsstrom eine monochromatische Lichtquelle und sorgen so für eine Ablenkung des Lichts. Dieses Streulicht wird von Detektoren erfasst und führt zur Bestimmung der Größe und Granularität. Die gebundenen

Fluorochrome werden hierbei von der Lichtquelle zur Fluoreszenz angeregt, die ebenfalls von Detektoren vermessen wird.

Die Phagen der Ausgangsbibliotheken (Tomlinson I & J) und der einzelnen Selektionsrunden wurden wie in Kapitel 3.4.1 produziert und deren Bindeaktivität zu NCI-H82 und PBMC's analysiert. Die Hyperphagensuspensionen wurden einheitlich auf einen Titer von 10^{11} cfu/ml eingestellt und für 2 h in 4 % MPBS auf einem Rotator geblockt. Währenddessen wurden 4×10^5 Zellen abgenommen und 5 min in FACS Wasch Puffer (FACS WP; PBS, 0,2 % BSA, 0,1 % NaN_3 , pH 7,4) bei 2.000 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 100 μl geblockter Phagensuspension aufgenommen und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Danach wurde zu den Zellen 1 ml FACS WP gegeben und erneut 5 min bei 2.000 g zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 100 μl eines 1:5.000 in FACS WP verdünnten monoklonalen Maus anti-M13 Antikörpers aufgenommen und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde das Zellpellet in 100 μl FACS WP aufgenommen. Die Detektion der Bindung erfolgte durch Zugabe von 1 μg eines FITC-gekoppelten Ziege anti-Maus Antikörpers und Inkubation für 30 min bei 4 °C. Nach letztmaligem Waschen wurden die Zellen in 500 μl 1 % Paraformaldehyd aufgenommen und im Durchflusszytometer gemessen. Zur Kontrolle des Hintergrundsignals und auf Grund der Eigenfluoreszenz von Zellen wurden auch immer Zellen ohne Phagen gefärbt und an diesen die Laserintensität so eingestellt, dass sich das gemessene Fluoreszenzsignal im vorderen Bereich des Graphen befand. Mit diesen Einstellungen wurden dann alle weiteren Färbungen gemessen, wobei eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität eine Bindung der scFv-Phagenpartikel anzeigte.

3.4.4 Polyklonaler Phagen-ELISA

Um die Anreicherung SCLC-spezifischer Antikörper zu überprüfen, wurde neben der Phagen-Durchflusszytometrie auch ein polyklonaler Phagen-ELISA durchgeführt. Hierbei wurde die Bindeaktivität der einzelnen Selektionsrunden analysiert und mit der Ausgangsbibliothek verglichen. Die Bindeaktivität wurde auf Membranfragmenten (MF) von NCI-H82 und PBMC's untersucht und zusätzlich auf Plastik, da Phagen sehr plastikaffin sind.

Die Membranfragmente wurden wie in Kapitel 3.1.5 beschrieben hergestellt, 1:10 in PBS verdünnt und davon 100 μl pro Well über Nacht bei 4 °C in einer Immunplatte immobilisiert. Nach dreimaligem Waschen der Immunplatte mit PBS wurden die Membranfragmente mit 2 % MPBS für 2 h unter Schütteln geblockt. Die polyklonalen scFv-präsentierenden Phagen der Ausgangsbibliothek und der drei Selektionsrunden wurden produziert (3.4.1) und der Titer einheitlich auf eine Konzentration von 10^{11} cfu/ml eingestellt. Bei der Produktion wurden Hyperphagen verwendet, um durch die polyvalenten scFv-Phagenpartikel ein starkes Signal zu erhalten. Die Phagensuspensionen wurde 1:1 mit 4 % MPBS gemischt und ebenfalls für 2 h auf einem Rotator geblockt. Nach dem

Blocken wurde die Platte erneut drei Mal gewaschen und die Phagen als Triplikate auf die Membranfragmente bzw. Plastikkontrolle gegeben. Nach 1 stündiger Inkubation auf dem Schüttler wurde die Platte drei Mal gewaschen und anschließend die gebundenen Phagen mit einem HRP-gekoppelten anti-M13 Antikörper detektiert. Der Antikörper wurde hierbei 1:5.000 in 2 % MPBS verdünnt, davon 100 µl in jedes Well pipettiert und 1 h unter Schütteln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurde in jedes Well 100 µl Tetramethylbenzidin (TMB) gegeben und für 5 min abgedeckt auf einem Schüttler einwirken gelassen. Anschließend wurde die enzymatische Farbumwandlung mit 100 µl 2 M H₂SO₄ abgestoppt und die Absorption bei 450 nm Wellenlänge abzüglich der Referenz bei 690 nm im ELISA-Reader gemessen.

3.4.5 Monoklonaler Phagen-ELISA

Zur Analyse der Bindeaktivität einzelner Phagenklone wurde ein monoklonaler Phagen-ELISA auf NCI-H82 MF, PBMC MF und BSA durchgeführt. Die Membranfragmente wurden hierfür im Verhältnis von 1:10 in PBS verdünnt und vom BSA 5 µg in 100 µl PBS pro Well über Nacht bei 4 °C in einer Immunplatte immobilisiert. Für die monoklonale scFv-Phagenproduktion wurden die Bakterien der dritten Selektionsrunde auf 2xYT_{Amp/Gluc}-Agarplatten in verschiedenen Verdünnungsstufen (10⁻² - 10⁻⁸) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Einzelne Klone wurden von den Agarplatten gepickt und in je 150 µl 2xYT_{Amp/Gluc}-Medium in eine 96-Well Platte übertragen. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C, 180 rpm, wurden 2 µl jedes Wells in 150 µl 2xYT_{Amp/Gluc}-Medium auf eine neue 96-Well Platte (Arbeitsplatte) überführt. Zu den über Nacht gewachsenen Kulturen wurden pro Well 30 µl Glycerol pipettiert und die Platte als Back-up bei -80 °C eingefroren. Nach 2 h Inkubation bei 37 °C und 180 rpm wurden die Kulturen der Arbeitsplatte mit 3 x 10⁸ Hyperhagen 30 min stationär und weitere 30 min schüttelnd jeweils bei 37 °C inkubiert. Dann wurde die Platte für 10 min bei 1.800 g und 4 °C zentrifugiert und die Pellets in 200 µl 2xYT_{Amp/Kann/IPTG}-Medium resuspendiert. Die Produktion der scFv-Phagen wurde für 18 - 20 h bei 30 °C und 180 rpm induziert. Danach wurde die Platte erneut unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert, 60 µl des phagenhaltigen Überstands zu 60 µl 4 % MPBS pipettiert und die Phagen 2 h unter Schütteln geblockt. Gleichzeitig wurden die MF und das BSA in der Immunplatte mit 200 µl 2 % MPBS auf einem Schüttler geblockt. Die Inkubation und die Detektion der scFv-Phagen erfolgten wie beim polyklonalen Phagen-ELISA (3.4.3).

Von einzelnen Klonen, die Bindeaktivität zu den NCI-H82 MF und nicht zu den PBMC MF und BSA zeigten, wurden für die weitere Charakterisierung die scFv-Gensequenzen mittels Kolonie-PCR amplifiziert (3.2.1) und diese sequenziert (3.2.4).

3.4.6 Ortsgerichtete Mutagenese

Die Diversität der Tomlinson Bibliothek J beruht auf dem künstlichen Einbau von NNK Triplets in den CDR (1.3). Hierdurch kommt es jedoch mit 3 % Wahrscheinlichkeit zum Auftreten eines TAG amber Stopcodons in der Antikörpersequenz. In dem TG1 Suppressorstamm der Bibliothek wird dieses Stopcodon überlesen und als Glutamin (CAG) translatiert. Für die Produktion der löslichen scFv's in dem non-Suppressorstamm BL21(DE3) musste dieses Stopcodon daher durch eine ortsgerichtete Mutation entfernt werden, so dass auch in non-Suppressorstämmen an dieser Stelle ein Glutamin translatiert wurde. Durch die ortsgerichtete Mutagenese wurde die Thyminbase gegen eine Cytosinbase mittels PCR ausgetauscht, so dass TAG zu CAG wurde. Hierfür wurden Primerpaare mit der Lasergene Software von DNA-STAR „designt“, die den Austausch ermöglichten. Da sich die Sequenzen der selektionierten Klone unterschieden, wurden für jeden Klon unterschiedliche Primer entwickelt (s. Anhang).

Zunächst wurde das Plasmid in der PCR mit den Mutagenese-Primern amplifiziert und so das Stopcodon entfernt. Um mögliche Fehler bei der Amplifikation zu vermeiden, wurde hierfür *Pfu* DNA Polymerase verwendet, welche eine 3' - 5' Exonuklease Fehlerkorrekturaktivität besitzt und somit DNA akkurater amplifiziert als *Taq* DNA Polymerase. Die PCR wurde wie folgt durchgeführt:

Tabelle 9: PCR-Ansatz und -Programm der ortsgerichteten Mutagenese

PCR-Ansatz		PCR-Programm		Zykluszahl
10 x Puffer	5 µl	initiale Denaturierung	1 min, 95 °C	1
dNTP Mix	0,5 µl (200 µM)	Denaturierung	1 min, 95 °C	12
3' Primer	1 µl (10 pmol)	Annealing	1 min, 55 °C	
5' Primer	1 µl (10 pmol)	Elongation	5 min, 72 °C	
<i>Pfu</i> Polymerase	1 µl (2,5 U)	Finale Elongation	5 min, 72 °C	1
Template	50 ng	Kühlung	∞, 4 °C	1
ddH ₂ O	ad 50 µl			

Die synthetisierte DNA war nach der PCR im Gegensatz zum ursprünglichen, in Bakterien amplifizierten Plasmid nicht methyliert. Durch diesen Unterschied konnte das Template-Plasmid durch einen Restriktionsverdau abgebaut werden. Hierfür wurde das Restriktionsenzym *DpnI* verwendet, welches nur die methylierte oder hemimethylierte DNA-Sequenz 5'-Gm⁶ATC-3' schneidet. Hierdurch erfolgte ein selektiver Abbau des methylierten Template-Plasmids, wohingegen das mutierte Plasmid intakt blieb. Zu dem PCR-Produkt wurden 1 µl (10 U) Enzym gegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert.

Anschließend erfolgte eine Hitzeschocktransformation in XL1-Blue Bakterien wie in 3.2.7 beschrieben. Für die Transformation wurden 5 µl des verdauten PCR-Produkts eingesetzt. Nach Ausplattieren der Bakterien auf eine 2xYT_{Amp/Gluc}-Agarplatte und Inkubation über Nacht bei 37 °C, wurden die scFv-Antikörpersequenzen einzelner Klone mittels Kolonie-PCR amplifiziert (3.2.1) und

anschließend der Mutationserfolg durch eine Sequenzierung überprüft (3.2.4). Bei erfolgreicher Mutation wurde das Plasmid mittels Plasmidpräparation aufgereinigt (3.2.5) und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.5 Herstellung und Charakterisierung von scFv-Fc Fusionsproteinen

Nach Bindungsanalyse der scFv-Phagenpartikel an Membranfragmenten im monoklonalen Phagen-ELISA (3.4.5) sollten die scFv's anschließend als lösliche Proteine hergestellt und analysiert werden.

3.5.1 Umwandlung der scFv's in Fc-Fusionsproteine

Für die Herstellung löslicher Antikörperfragmente wurden die scFv's in scFv-Maus-Fc Fusionsproteine umgewandelt. Der Maus-Fc Teil ermöglichte den Nachweis der Antikörper mit Standard anti-Maus Sekundärantikörpern. Außerdem entstanden Fc Fusionsprotein-Dimere, da der Fc-Teil aus CH2, CH3 und Hinge-Region bestand. Die produzierten scFv-Fc Fusionsproteine enthielten somit zwei Antigenbindungsstellen (bivalente Bindeaktivität). Für die Umwandlung wurden die scFv Gensequenzen nach erfolgreicher ortsgerichteter Mutagenese aus dem Bibliotheksphagemid pIT2 durch einen Restriktionsverdau mit den Enzymen *Sfi*I - *Not*I geschnitten und für die prokaryotische Expression in den pMT2 Vektor bzw. für die eukaryotische Expression in den pMS2 Vektor kloniert (3.2.6). Die scFv's wurden hierbei im Leseraster oberhalb des im Vektor enthaltenen murinen IgG2a konstanten Teils ligiert, so dass die Fusionproteine anschließend in BL21(DE3) (3.3.1) oder HEK293T Zellen (3.1.4) exprimiert werden konnten.

Der prokaryotische Expressionsvektor pMT2 wurde aus dem pET27b Vektor von Novagen abgeleitet [122]. Der Vektor enthält einen murinen Immunglobulin Gamma 2a Fc-Teil (mIgG2a) und ermöglicht somit die Produktion von scFv-Fc Fusionsproteinen. Diese können über das vom Vektor stammende His₆ tag, FLAG tag oder Strep tag II aufgereinigt werden. Durch die Pektatlyase B (pelB) Leadersequenz von *Erwinia carotovora* werden die Fusionproteine ins Periplasma geleitet, in dem es auf Grund der oxidierenden Bedingungen zur korrekten Faltung der Proteine kommt. Die Transkription kann durch Zugabe von IPTG induziert werden und steht unter der Kontrolle des T7-Promotors und Terminators. Eine zusätzliche Kanamycinresistenz ermöglicht das selektive Wachstum von Plasmid-enthaltenden Bakterien in Kanamycin-haltigem Medium.

Der bicistronische, eukaryotische Expressionsvektor pMS2 enthält ebenfalls eine murine IgG2a Domäne. Die Transkription steht unter der Kontrolle des Cytomegalievirus-Promotors (CMV), wodurch eine hohe Expressionsrate ermöglicht wird. Über die Immunglobulin Kappa Leadersequenz werden die Fusionsproteine in den Überstand sezerniert, ein Strep tag II, ein His₆ tag und ein Myc tag

ermöglichen die anschließende Aufreinigung. Die interne ribosomale Eintrittsstelle (IVS/IRES) ermöglicht die Kotranslation eines verstärkten grünen Fluoreszenzproteins („enhanced green fluorescence protein“, eGFP), wodurch die Aufnahme des Vektors nach der Transfektion der Zellen überprüft werden kann. Durch eine Zeocin-Resistenz besteht die Möglichkeit unter Selektionsmedium transfizierte von nicht-transfizierten Zellen zu trennen. Der im Vektor enthaltene prokaryotische Replikationsursprung ColE1 und eine Ampicillinresistenz ermöglichen eine bakterielle Amplifikation des Vektors.

3.5.2 ELISA-basierte Bindungsanalyse der scFv-Fc Fusionsproteine

Die Bindeaktivität der hergestellten scFv-Fc's wurde auf immobilisierten MF von NCI-H82 bzw. PBMC's und BSA im ELISA untersucht. Hierfür wurden die MF 1:10 in PBS verdünnt und als Triplikate in die Wells einer Immunoplatte pipettiert. Gleichzeitig wurden 5 µg BSA in 100 µl PBS ebenfalls als Triplikate in die Platte gegeben. Die Immobilisierung erfolgte über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurde die Platte drei Mal mit PBS gewaschen und für 2 h auf einem Schüttler mit 200 µl 2 % MPBS geblockt. Nach erneutem dreimaligen Waschen wurden in die Wells entweder 1 µg aufgereinigte scFv-Fc's oder 100 µl 1:1 in 4 % MPBS verdünnter Kulturüberstand der eukaryotischen Expression gegeben. In drei Wells wurde zu diesem Zeitpunkt 100 µl 2 % MPBS pipettiert, um das Hintergrundsignal des Sekundärantikörpers ohne Primärantikörper zu messen. Dann wurden die Wells drei Mal mit PBS gewaschen, bevor zum Nachweis der Bindeaktivität ein HRP-markierter Kaninchen anti-Maus Sekundärantikörper, 1:25.000 in 2 % MPBS verdünnt, in jedes Well gegeben wurde. Nach dreifachem Waschen erfolgte die Farbreaktion durch Zugabe von 100 µl TMB. Die Oxidation des Substrats wurde je nach Farbintensität nach 5 - 15 min mit 100 µl 2 M H₂SO₄ abgestoppt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm abzüglich der Referenzwellenlänge von 690 nm gemessen.

3.5.3 Durchflusszytometrie-basierte Bindungsanalyse der scFv-Fc Fusionsproteine

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde eine Bindungsanalyse der scFv-Fc's an vitalen Zellen durchgeführt. Die Analyse erfolgte auf den SCLC-Zelllinien NCI-H69, NCI-H82 und DMS 273. Zur Kontrolle der Spezifität der selektionierten Antikörper wurden PBMC's verwendet. 4×10^5 Zellen wurden mit 1 ml FACS Waschpuffer (PBS, 0,2 % BSA, 0,1 % NaN₃, pH 7,4) für 5 min bei 2.000 g zentrifugiert. Die Zellen wurden entweder in 1 µg aufgereinigtem scFv-Fc in 100 µl FACS WP oder in 100 µl Zellkulturüberstand aufgenommen und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Zur Kontrolle des Hintergrunds wurden zusätzlich auch immer Zellen ohne Erstantikörper gefärbt. Nach Zugabe von 1 ml FACS WP wurden die Zellen erneut zentrifugiert und das Pellet in 100 µl FACS WP

aufgenommen. Zum Nachweis der Bindung wurde hierzu 1 µg FITC-markierter Ziege anti-mouse Sekundärantikörper („goat anti-mouse“-FITC, gam-FITC) zugegeben und 30 min bei 4 °C inkubiert. Nach erneutem Waschen mit 1 ml FACS WP wurde das Zellpellet in 500 µl 1 % PFA aufgenommen und im Durchflusszytometer gemessen.

3.5.4 Analyse des Internalisierungsverhaltens der Antikörperfragmente

Für einen möglichen therapeutischen Einsatz der selektionierten Antikörperfragmente sollten die scFv's an ein Toxin gekoppelt und somit rekombinante Immuntoxine (IT) hergestellt werden. Voraussetzung für eine zytotoxische Wirkung von IT ist eine schnelle, endozytische Aufnahme durch die Zielzellen [67]. Aus diesem Grund wurde das Internalisierungsverhalten der selektionierten scFv's untersucht. Die Analyse erfolgte sowohl Durchflusszytometrie-basiert, als auch im Konfokalmikroskop [123].

Für die Durchflusszytometrie wurden 4×10^5 DMS 273 Zellen nach Waschen in 1 ml FACS WP mit 1 µg scFv-Fc Fusionsprotein für 30 min bei 4 °C inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen in 100 µl Waymouth Medium mit 10 % FKS, 1 % P/S aufgenommen und für 15, 30, 60, 120 oder 240 min im Brutschrank inkubiert. Hierdurch wurde eine Endozytose der Antikörper durch die Zellen ermöglicht. Zusätzlich wurden Zellen mit dem Fusionsprotein durchgehend bei 4 °C inkubiert. Diese Zellen dienten bei der späteren Analyse als nicht-internalisierende Kontrolle. Nach Waschen der Zellen wurde das Pellet in 100 µl FACS WP aufgenommen und mit 1 µg goat anti mouse-FITC (gam-FITC) versetzt. Nach Inkubation bei 4 °C für 30 min und letztmaligem Waschen wurden die Zellen in 500 µl 1 % PFA aufgenommen und im Durchflusszytometer gemessen.

Für die Konfokalmikroskopie wurden 3×10^4 DMS 273 Zellen in 300 µl Kulturmedium auf 8-Kammer Zellkulturobjektträgern ausplattiert und im Brutschrank inkubiert. Nach 48 h wurde das Medium vorsichtig abgenommen und die Zellen mit 200 µl eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 1 µg scFv-Fc Fusionsprotein für 30 min bei 4 °C inkubiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen gewaschen. 150 µl Medium mit 1 µg gam-FITC wurden in die Kammern gegeben und ein Objektträger bei 4 °C und ein weiterer bei 37 °C für 2 h inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen bei RT für 10 min mit 200 µl 70 % Ethanol fixiert. Das Ethanol wurde entfernt und die Zellkerne mit DAPI gegengefärbt. Die Internalisierung der Inkubationen bei 37 °C und bei 4 °C wurde anschließend am Konfokalmikroskop verglichen. Die Aufnahmen erfolgte mit dem *Isis color fluorescence imaging system*.

3.6 Herstellung und Charakterisierung von Fab-Fragmenten

Für einen Immunhistochemie-basierten, diagnostischen Einsatz der selektionierten Antikörper wurden die scFv Antikörperfragmente in Fab-Fragmente umgewandelt und analysiert.

3.6.1 Umwandlung der scFv's in Fab-Fragmente

Für die Umwandlung der selektionierten scFv's in Fab-Fragmente wurden zunächst mittels PCR die entsprechenden Restriktionsschnittstellen an die variable leichte und variable schwere Kette angelagert (Restriktionsschnittstellen von *SacI* - *XbaI* für V_L und von *XhoI* - *HindIII* für V_H). Die Primer bestanden hierbei aus einem sequenzspezifischen Teil und einer überhängenden Restriktionsenzym-Erkennungssequenz. Die Anlagerung der Schnittstellen wurde auf einem Agarosegel analysiert (3.2.2) und die PCR-Produkte vor Restriktionsverdau aufgereinigt. Nach dem Restriktionsverdau (3.2.6) erfolgte die Klonierung in den pComb3XSS basierten Vektor pGAL. Dieser Vektor enthält eine humane konstante kappa Kette (C_κ) und eine humane CH1 Region der Immunglobulin 1 gamma Kette (CH1 IgG1), die die Umwandlung in ein Fab-Fragment ermöglichen. Zunächst wurde die variable leichte Kette in den Vektor kloniert und der Einbau mittels Kolonie-PCR (3.2.1) und Sequenzierung (3.2.4) überprüft. Danach wurde die variable schwere Kette kloniert und ebenfalls der korrekte Einbau kontrolliert. Für die prokaryotische Expression wurden die Fab-Fragmente über die Restriktionsenzyme *SfiI* - *AscI* aus pGAL geschnitten und in den pMT2 Expressionsvektor kloniert. Die Leadersequenz pelB führt zum Transport der leichten und schweren Kette ins Periplasma. Hier ermöglichen die oxidierenden Bedingungen die Ausbildung von Disulfidbrücken, wodurch die schwere und leichte Kette zum Fab-Fragment verknüpft werden. Die Expression erfolgte wie in 3.3.1 beschrieben.

3.6.2 Durchflusszytometrie-basierte Bindungsanalyse der Fab-Fragmente

Die Überprüfung der Funktionalität der Fab-Fragmente erfolgte im Durchflusszytometer auf NCI-H82 und DMS 273 Zellen. Zur Kontrolle der Spezifität wurden zusätzlich PBMC's und die Negativzelllinien NK92-C1 und NALM-6 gefärbt. 4×10^5 Zellen wurden nach Zentrifugation für 5 min bei 2.000 g in FACS WP mit 1 μ g Fab-Fragment bei 4 °C für 30 min inkubiert. Nach Waschen mit 1 ml FACS WP wurden die Zellen in 100 μ l FACS WP aufgenommen und mit 0,3 μ g Maus anti-human IgG F(ab)₂ Antikörper versetzt. Die Inkubation erfolgte ebenfalls für 30 min bei 4 °C, bevor die Zellen erneut gewaschen und die Bindung durch Zugabe von 15 ng PE konjugiertem Streptavidin (SA-PE) für weitere 30 min bei 4 °C detektiert wurde. Eine Färbung der Zellen ohne Fab-Fragment wurde zur Kontrolle des Hintergrunds mitgeführt.

Zusätzlich wurde überprüft, ob es sich bei den Antigenen um Trypsin-sensitive Oberflächenproteine handelt. Hierfür wurden 4×10^5 DMS 273 Zellen abgenommen und mit FACS WP gewaschen. Das Zellpellet wurde in 1 ml Trypsin-EDTA bzw. PBS aufgenommen und für 15 min bei 37 °C, 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Durch das Trypsin wurden die Oberflächenproteine enzymatisch abgebaut, so dass diese für eine mögliche Bindung der Antikörper nicht mehr zur Verfügung standen [124]. Nach der Inkubation wurden 10 ml Waymouth Medium zugegeben und die Zellen für 5 min bei 2.000 g zentrifugiert, um das Trypsin-EDTA bzw. PBS zu entfernen. Danach wurden die Zellen in 1 ml FACS WP gewaschen. Die weitere Färbung erfolgte wie oben beschrieben. Das gemessene Fluoreszenzsignal der Trypsin-behandelten Zellen wurde anschließend mit dem Signal der PBS-behandelten Zellen verglichen.

3.6.3 Immunhistochemische Bindungsanalyse der Fab-Fragmente

Die Bindeaktivität der Fab-Fragmente wurde auf Patienten FFPE Routinematerial verschiedener SCLC Biopsien untersucht. Für ein optimales Färbeergebnis wurden verschiedene Antigenmaskierungsverfahren, wie schon bei der *On Slide* Selektion in 3.4.2, durchgeführt. Die Immunhistochemie erfolgte mit dem ABC Ultra Sensitive Staining Kit von Pierce.

Nach Entparaffinierung und Epitopfreilegung wurden die Gewebeschnitte zur Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität 30 min mit 0,3 % H₂O₂ in Methanol bedeckt. Nach 20 min Waschen der Gewebe in IHC Waschpuffer (Tris-Puffer, 0,05 % Tween) wurden die Schnitte für 30 min mit Blockpuffer bedeckt, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend wurde der Blockpuffer entfernt und die Fab-Fragmente für 2 h bei RT zugegeben. Dann wurde das Gewebe 10 min mit IHC Waschpuffer gewaschen und zur Detektion von gebundenen Fab-Fragmenten mit 1,5 µg biotinyliertem Maus anti-human IgG F(ab)₂ Antikörper in 100 µl Blockpuffer für 30 min bedeckt. Währenddessen wurde der Avidin-Biotin-Komplex („*avidin-biotin-complex*“, ABC) vorbereitet. Hierfür wurden 180 µl Reagenz A und 180 µl Reagenz B zu 10 ml PBS gegeben und 30 min stehen gelassen. Die Schnitte wurden erneut 10 min gewaschen und 30 min mit dem ABC bedeckt. Die Farbreaktion erfolgte durch Zugabe von DAB-Substrat für 5 min, bevor das Gewebe erneut gewaschen und die Zellkerne für 1 min mit Hämatoxylin gegengefärbt wurden. Alle Inkubationen wurden in einer feuchten Kammer durchgeführt. Als Negativkontrolle dienten Schnitte von gesundem Lungengewebe. Um eine unspezifische Färbung durch den biotinylierten Sekundärantikörper und den ABC ausschließen zu können, wurden als Hintergrundkontrolle Schnitte ohne Zugabe der Fab-Fragmente gefärbt. Anschließend wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 96 %, 100 %) und Xylol dehydriert und mit Eindeckelmedium und einem Deckglas fixiert. Die Schnitte wurde mit Hilfe eines Lichtmikroskops begutachtet und fotografiert.

Zusätzlich wurden Tissue Micro Arrays (TMA) von verschiedenen SCLC Fällen und gesunden Organen gefärbt, um die Spezifität der selektionierten Antikörper zu verifizieren. Bei den TMA handelte es sich um FFPE Schnitte mit Stanzbiopsaten von 35 SCLC Fällen unterschiedlicher Stadien jeweils als Duplikate und um 20 Stanzbiopsate verschiedener normaler Organe, wobei sich jedes Organ in 5-facher Ausführung auf dem Objektträger befand (Abb. 11). Die Färbung erfolgte analog zur Färbung des Patienten Routinematerials.

Alle Immunhistochemie-Färbungen wurden von Herrn Prof. Dr. Gattenlöhner, dem Leiter der Pathologie in Gießen, begutachtet.

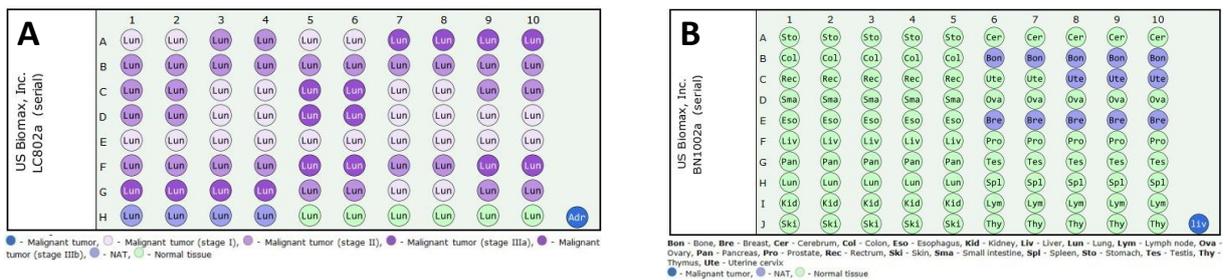


Abb. 11: Übersicht der Tissue Micro Arrays

Stanzbiopsate von 35 verschiedenen SCLC Fällen jeweils in doppelter Ausführung (A) und 20 normalen Organen in 5-facher Ausführung (B). Die TMA wurden immunhistochemisch gefärbt, um die Spezifität der selektionierten Antikörper zu verifizieren. NAT = Tumorangrenzendes Normalgewebe („normal adjacent tissue“). Quelle: US Biomax, Inc. Produktbeschreibung LC802a und BN1002a

3.7 Herstellung und Charakterisierung von rekombinanten Immuntoxinen

Für einen möglichen therapeutischen Einsatz der selektionierten Antikörper wurden durch Anlagerung eines bakteriellen Toxins rekombinante Immuntoxine hergestellt und deren zytotoxisches Potenzial untersucht. Bei dem verwendeten Toxin handelte es sich um eine verkürzte Form des *Pseudomonas* Exotoxin A (ETA'), bei dem die zellbindende Domäne I entfernt wurde [125]. Durch die Deletion der Domäne I ist die Bindung zum α 2-Makroglobulinrezeptor (CD91) nicht mehr möglich, so dass bei Trennung des Toxins von seinem Antikörper keine unspezifische Zellbindung und Aufnahme stattfinden kann.

3.7.1 Herstellung rekombinanter Immuntoxine

Die drei SCLC spezifischen scFv's 3B, 3E und 6E wurden über die Restriktionsschnittstellen *Sfi*I - *Not*I aus dem pIT2-Vektor geschnitten und in den kompatiblen Expressionsvektor pMT-ETA' kloniert (3.2.6). Dieser Vektor enthält die verkürzte Version des Exotoxins und außerdem ein N-terminales His₁₀ tag für die Aufreinigung der IT's. Die Expression erfolgte in BL21(DE) unter Stressbedingungen

durch IPTG Induktion wie in 3.3.1 beschrieben. Anschließend wurden die IT's über Ni-NTA Säulen aufgereinigt (3.3.2), eingengt und umgepuffert (3.3.3). Vor der Untersuchung des zytotoxischen Potenzials wurde die Bindeaktivität im Durchflusszytometer bestätigt. Hierfür wurden 4×10^5 DMS 273 Zellen mit $1 \mu\text{g}$ IT für 30 min bei 4°C inkubiert. Der Bindungsnachweis erfolgte mit dem Maus anti-ETA' Antikörper TC-1 [126] 1:100 in FACS WP verdünnt, gefolgt von $1 \mu\text{g}$ gam-FITC, jeweils für 30 min bei 4°C . Zwischen den Inkubationsschritten wurden die Zellen in 1 ml FACS WP durch Zentrifugation für 5 min bei 2.000 g gewaschen. Als Hintergrundmessung diente eine Färbung ohne Zugabe der IT's.

3.7.2 Analyse der proliferationshemmenden Wirkung

Zur Bestimmung der proliferationshemmenden Wirkung der IT's wurde die Zellviabilität durch einen XTT-Assay untersucht. Proliferierende Zellen zeichnen sich durch eine hohe Stoffwechselaktivität aus. Diese Stoffwechselaktivität lässt sich durch die Reduktion des Tetrazoliumsalzes XTT (2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-((phenylamino)carbonyl)-2H-tetrazoliumhydroxid) zu wasserlöslichem, orange-rotem Formazan beobachten und ist ein Maß für die Viabilität der Zellen [127]. Die Umwandlung wird durch den Elektronenakzeptor Phenazinmethosulfat (PMS) ermöglicht. Die hergestellte Menge an Formazan kann durch Messung der Absorption bei 450 nm bestimmt werden und ist proportional zur metabolischen Aktivität der Zellen. Kommt es zur Proliferationshemmung oder zum Absterben der Zellen durch ein Agens nimmt die metabolische Aktivität der Zellen ab, so dass die Umwandlung des XTT geringer oder gar nicht stattfindet.

Hierfür wurden die SCLC Zelllinien NCI-H69, NCI-H82 und DMS 273 nach Inkubation mit den IT's analysiert. Zur Kontrolle der spezifischen Wirkung wurden zusätzlich die von natürlichen Killerzellen abgeleitete Zelllinie NK92-C1 und die ALL Zelllinie NALM-6 mit den IT's behandelt. Außerdem wurden die DMS 273 Zellen mit dem irrelevanten IT H22-ETA' (anti-CD64) [128] inkubiert, um einen toxischen Einfluss von ETA' ohne zielgerichteten Transport ausschließen zu können. Hierfür wurden die Zellen in Triplikaten a $100 \mu\text{l}$ in eine 96-Well Platte ausgesät (Zellzahl siehe Tabelle 10) und bei 37°C , 5 % CO_2 im Brutschrank kultiviert. Nach 24 h wurden die Zellen mit absteigenden Konzentrationen der IT's behandelt (95; 47,5; 23,75; 11,88; 5,94 und 2,97 nM). Als Negativkontrolle wurden parallel dazu Zellen mit PBS behandelt, die Behandlung mit $200 \mu\text{g}$ Zeocin diente als Positivkontrolle. Nach 72 h Inkubation im Brutschrank wurde zu den Zellen $50 \mu\text{l}$ XTT/PMS-Lösung (1 mg/ml XTT; $15,3 \mu\text{g}/\text{ml}$ PMS) gegeben und diese für weitere 4 h im Brutschank inkubiert. Anschließend konnte der Metabolismus des XTT zu Formazan durch Messung der Absorption bei 450 nm mit Referenzmessung bei 690 nm im ELISA-Reader gemessen werden. Für die Auswertung der Zellviabilität und die Berechnung der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC_{50}) wurden die Messwerte normalisiert

auf die Zeocin-behandelte Positivkontrolle (\cong 0 % Viabilität) und die PBS-behandelten Zellen (\cong 100 % Viabilität).

Tabelle 10: Verwendete Zellzahl für den XTT-Assay

Zelllinie	Zelzahl pro Well	Medium
NCI-H69	$2,5 \times 10^4$	RPMI, 10 % FKS, 1 % P/S
NCI-H82	$1,25 \times 10^4$	RPMI, 10 % FKS, 1 % P/S
DMS 273	$6,25 \times 10^3$	Waymouth, 10 % FKS, 1 % P/S
NK92-C1	$6,25 \times 10^3$	MEM α , 12,5 % FKS, 12,5 % Pferdeserum, 0,1 mM Mecaptoethanol, 1 % P/S
NALM-6	1×10^4	RPMI, 10 % FKS, 1 % P/S

3.7.3 Analyse der Apoptoseinduktion

Eine Apoptoseinduktion durch die IT's wurde mit Hilfe eines Annexin V/7AAD-Assays untersucht. Bei lebenden Zellen befindet sich Phosphatidylserin (PS) auf der inneren, zytoplasmatischen Seite der Zellmembran. Während der Apoptose kommt es jedoch zum Verlust der Membranasymmetrie wodurch das PS auf die äußere, extrazelluläre Seite translokalisiert wird [129]. Dieser Prozess findet am Anfang der Apoptose statt, weshalb PS auf der Oberfläche von Zellen ein Nachweis für frühe Apoptose ist. Annexin V ist ein Protein (Antikoagulans), das kalziumabhängig mit hoher Affinität PS bindet. Durch Anlagerung eines Flouorchroms an Annexin V kann PS auf der Oberfläche spezifisch nachgewiesen und damit früh-apoptotische Zellen detektiert werden. Zur Differenzierung von früh-apoptotischen und spät-apoptotischen bzw. nekrotischen Zellen werden die Zellen parallel zu Annexin V mit einem Vitalfarbstoff wie 7-Amino-Actinomycin D (7AAD) angefärbt. Bei intakten Zellen kann dieser Vitalfarbstoff auf Grund der Zellmembran nicht ins Zellinnere gelangen, wohingegen Zellmembranen von geschädigten und toten Zellen permeable sind. Der Vitalfarbstoff interkaliert mit der DNA und färbt hierdurch spät-apoptotische und nekrotische Zellen an.

Für die Analyse wurden $6,25 \times 10^3$ DMS 273 Zellen in 6-facher Ausführung in einer 96-Well Platte ausplattiert und bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert. Nach 24 h wurden die Zellen mit 1 μ g (\cong 95 nM) der IT's behandelt. PBS, Zeocin und das irrelevante IT H22-ETA' (anti-CD64) [128] dienten als Kontrollen. Nach 72 h Inkubation wurde der Überstand in ein 1,5 ml Gefäß überführt, die Zellen mit Zelldissoziationslösung abgelöst, zum Überstand gegeben und 5 min bei 1.500 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 500 μ l Waymouth Medium aufgenommen und erneut zentrifugiert. Dann wurden die Zellen zwei Mal mit 1 ml eiskaltem PBS gewaschen und anschließend in 100 μ l 1 x Annexin Bindungspuffer aufgenommen. Zur Detektion der apoptotischen bzw. nekrotischen Zellen wurden hierzu 2,5 μ l Alexa Fluor 488 markiertes Annexin V und 0,125 μ g 7AAD pipettiert und 15 min bei RT inkubiert. Danach wurden 100 μ l 1 x Annexin Bindungspuffer zugegeben und die Zellen im Durchflusszytometer gemessen.

3.8 Datenanalyse

Alle statistischen Analysen wurden mit der GraphPad Prism 6 Software durchgeführt. Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Ein signifikanter Unterschied zwischen zwei unabhängigen Messergebnissen wurde mit Hilfe eines zweiseitigen T-Tests bestimmt, wobei $p < 0,05$ als signifikant (*), $p < 0,01$ als hoch signifikant (**) und $p < 0,001$ als höchst signifikant (***) eingestuft wurden. Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) der Immuntoxine wurde durch nicht-lineare Regression einer sigmoidalen Dosis-Wirkungs-Kurve errechnet.

4 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine neue Strategie zur Antikörperselektion etabliert, die auf der Phage Display Technologie in Kombination mit Formalin-fixierten und in Paraffin-eingebetteten (FFPE)-Gewebeschnitten basiert. Die isolierten Antikörperfragmente zeigten eine SCLC-spezifische Bindeaktivität und wurden in verschiedene Antikörperformate (scFv-Fc Fusionsprotein, Fab-Fragment und rekombinantes Immuntoxin) überführt, um einen möglichen diagnostischen und therapeutischen Einsatz zu evaluieren.

4.1 Selektion SCLC-spezifischer Antikörperfragmente

Die Selektion SCLC-spezifischer Antikörperfragmente erfolgte an Patientenmaterial, welches als Formalin-fixiertes und in Paraffin-eingebettetes Gewebe (FFPE) aus der Routinediagnostik vorlag. Zur Etablierung der Methode wurden die Selektionen auf immobilisierten Gewebeschnitten von vier verschiedenen SCLC Patientenbiopsaten durchgeführt. Hierfür wurden die humanen scFv-Antikörperbibliotheken Tomlinson I und J vom Medical Research Council aus Cambridge (England) verwendet.

Um eine Anreicherung von Antikörpern gegen krankheitsirrelevante Antigene zu minimieren, wurde vor jeder Selektionsrunde eine Depletion (Negativselektion) auf pathologisch unauffälligem Lungengewebe durchgeführt. Des Weiteren erfolgten Selektionen auf Patientenmaterial, das nahezu vollständig aus malignem SCLC-Gewebe bestand. Die Beurteilung des Gewebes erfolgte hierbei von Herrn Prof. Dr. Gattenlöhner, dem Leiter des Instituts für Pathologie des Uniklinikums in Gießen.

Pro Patient wurden drei Selektionsrunden durchgeführt, wobei in der ersten Selektionsrunde Hyperphagen für eine polyvalente Darstellung der scFv's auf den Phagenpartikeln verwendet wurden und in den beiden folgenden Runden durch die Verwendung von Helferphagen eine monovalente Darstellung erzielt wurde. Durch die Umstellung von polyvalenter zu monovalenter Darstellung sollten affinere Antikörper selektioniert werden, da die Bindung bei monovalenter Darstellung rein von der intrinsischen Affinität und nicht von der Avidität bestimmt wird. Zusätzlich wurde die Waschstringenz von Runde zu Runde gesteigert, um so den Selektionsdruck auf affinere Antikörper zu erhöhen.

4.1.1 Überprüfung der Antikörperbibliotheken Tomlinson I und J

Die Bibliotheken wurden zunächst auf das Vorhandensein von scFv-Antikörpergenen (Insert) im Phagemid untersucht, um deren Funktionalität zu verifizieren und eine Anreicherung Insert-loser

Phagemide ausschließen zu können. Hierfür wurden die Phagemid-beinhaltenen Bakterien auf einer Agarplatte mit Ampicillin und Glucose ausplattiert und über Nacht inkubiert. Anschließend wurden von jeder Bibliothek zufällig 15 Klone gepickt und mittels Kolonie-PCR die scFv-Genfragmente amplifiziert. Bei korrekten scFv-Antikörpergenen sollte hierdurch ein PCR-Produkt von 935 bp Länge entstehen. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung war bei allen Klonen eine Bande entsprechender Größe zu sehen (Abb. 12), weshalb davon ausgegangen wurde, dass nahezu alle Phagemide der Bibliotheken ein scFv-Antikörpergen trugen.

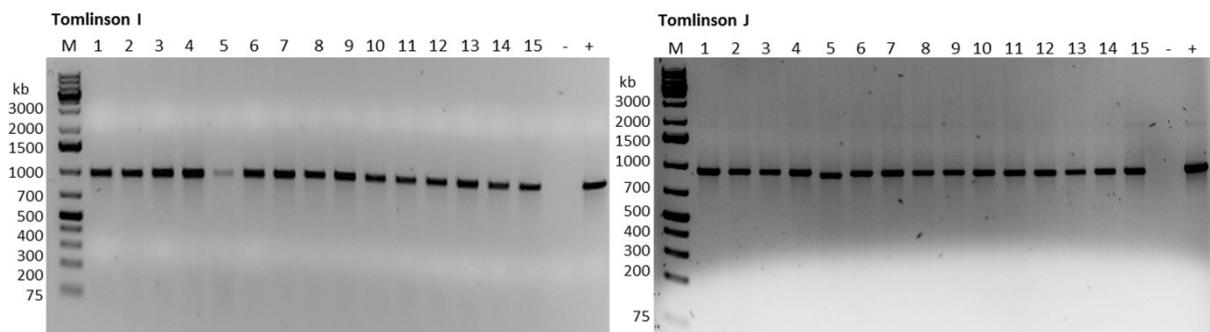


Abb. 12: PCR-Nachweis von scFv-Antikörpergenen der Antikörperbibliotheken Tomlinson I und J

Vor Verwendung wurden die scFv Antikörperbibliotheken Tomlinson I und J auf das Vorhandensein von scFv-Antikörpergenen (Insert) untersucht. Hierfür wurden nach Ausplattierung je 15 Klone der Bibliotheken zufällig ausgewählt und die scFv-Fragmente mittels Kolonie-PCR amplifiziert. Die entstandenen PCR-Produkte aller Klone zeigten die berechnete Größe von 935 bp. Als Negativkontrolle (-) wurde bei der PCR-Reaktion statt Template Wasser verwendet, als Positivkontrolle (+) diente ein pT2 Phagemid mit verifiziertem scFv-Genfragment.

4.1.2 Anreicherung SCLC-spezifischer Antikörperfragmente

Ein Anzeichen für eine erfolgreiche Selektion ist die Anreicherung spezifischer Phagenpartikel im Phagenpool nach drei bis fünf aufeinanderfolgenden Selektionsrunden [130]. Zur Bestimmung des Anreicherungsfaktors wurde daher von jeder Runde das Verhältnis von Phagen-Input- zu Phagen-Output-Titer berechnet und mit der ersten Runde verglichen. Tabelle 11 zeigt die Input- und Output-Titer und die Anreicherungsfaktoren der einzelnen Runden aller vier Patienten. Hierbei sieht man bei der Selektion auf Patientenmaterial 1 keine Anreicherung spezifischer Phagen, das Verhältnis von Input- zu Output-Titer nahm sogar von Runde zu Runde ab. Im Gegensatz dazu erfolgte bei allen anderen Patienten eine Anreicherung. Vor allem bei der Selektion auf dem Gewebe von Patient 4 stieg das Verhältnis von Output- zu Input-Titer mit einem Faktor von 431 stark an.

Tabelle 11: Anreicherungsfaktoren der Selektionen auf verschiedenen SCLC Patientenbiopsaten

Patient	Bibliothek	Runde	Input-Titer	Output-Titer	Verhältnis Output/Input	Anreicherungsfaktor
1	Tomlinson I	1	$1,95 \times 10^{12}$	$5,46 \times 10^7$	$2,80 \times 10^{-5}$	-
		2	$7,15 \times 10^{13}$	$1,15 \times 10^8$	$1,61 \times 10^{-6}$	0,06
		3	$4,46 \times 10^{13}$	$2,50 \times 10^7$	$5,61 \times 10^{-7}$	0,02
	Tomlinson J	1	$2,50 \times 10^{12}$	$6,46 \times 10^7$	$2,58 \times 10^{-5}$	-
		2	$4,65 \times 10^{13}$	$4,30 \times 10^6$	$9,25 \times 10^{-8}$	0,0036
		3	$3,26 \times 10^{13}$	$7,20 \times 10^6$	$2,21 \times 10^{-7}$	0,0086
2	Tomlinson J	1	$5,65 \times 10^{12}$	$2,04 \times 10^7$	$3,60 \times 10^{-6}$	-
		2	$1,11 \times 10^{13}$	$2,05 \times 10^8$	$1,86 \times 10^{-5}$	5,2
		3	$1,54 \times 10^{13}$	$6,50 \times 10^8$	$4,24 \times 10^{-5}$	11,8
3	Tomlinson J	1	$1,40 \times 10^{12}$	$6,50 \times 10^5$	$4,64 \times 10^{-7}$	-
		2	$2,23 \times 10^{13}$	$1,82 \times 10^7$	$8,18 \times 10^{-7}$	1,76
		3	$1,61 \times 10^{13}$	$7,50 \times 10^8$	$4,67 \times 10^{-5}$	100,65
4	Tomlinson J	1	$1,40 \times 10^{12}$	$1,50 \times 10^5$	$1,07 \times 10^{-7}$	-
		2	$2,46 \times 10^{13}$	$1,88 \times 10^7$	$7,64 \times 10^{-7}$	7,14
		3	$3,87 \times 10^{13}$	$1,68 \times 10^9$	$4,35 \times 10^{-5}$	430,69

Der Anreicherungsfaktor gibt das Verhältnis von Output- zu Input-Titer der ersten Selektionsrunde im Vergleich zu den beiden folgenden Runden an.

Bei der späteren monoklonalen Analyse einzelner Klone der Selektion von Patient 1 im Phagen-ELISA zeigten die Binder aus der Bibliothek Tomlinson I eine deutlich geringere Bindeaktivität als die von Bibliothek J. Aus diesem Grund wurde für die Selektionen auf den drei weiteren Patientenbiopsaten nur die Bibliothek J verwendet.

4.2 Polyklonale Analyse der selektionierten Antikörperfragmente

Die Anreicherung SCLC-spezifischer Antikörperfragmente wurde in der Durchflusszytometrie unter Verwendung polyklonaler Phagensuspensionen der drei Selektionsrunden (3.4.3) auf NCI-H82 Tumorzellen und normalen PBMC's überprüft. Ein stärkeres Fluoreszenzsignal weist hierbei auf eine höhere Anzahl an bindenden scFv-Phagenpartikeln hin. Abb. 13 zeigt die Messergebnisse der Selektion auf Gewebe von Patient 1. Hierbei sieht man, dass es auf den NCI-H82 zu einem deutlichen Anstieg des Fluoreszenzsignals im Vergleich zu den Ausgangsbibliotheken kam. Bei Tomlinson I zeigten 33,32 % der scFv-Phagenpartikel der 3. Selektionsrunde eine Bindung, wohingegen innerhalb der Ausgangsbibliothek keine Bindeaktivität im Vergleich zur Kontrolle ohne Phagen zu sehen ist. Bei Tomlinson J wiesen 24,22 % der Phagen eine Bindeaktivität auf, wobei in der Ausgangsbibliothek nur 2,58 % der Phagen eine Bindung zeigten. Im Vergleich dazu kam es zu keinem Anstieg des Fluoreszenzsignals auf PBMC's, weder bei Tomlinson I, noch bei J. Hierdurch konnte eine Anreicherung SCLC-spezifischer scFv-Phagenpartikel nachgewiesen werden.

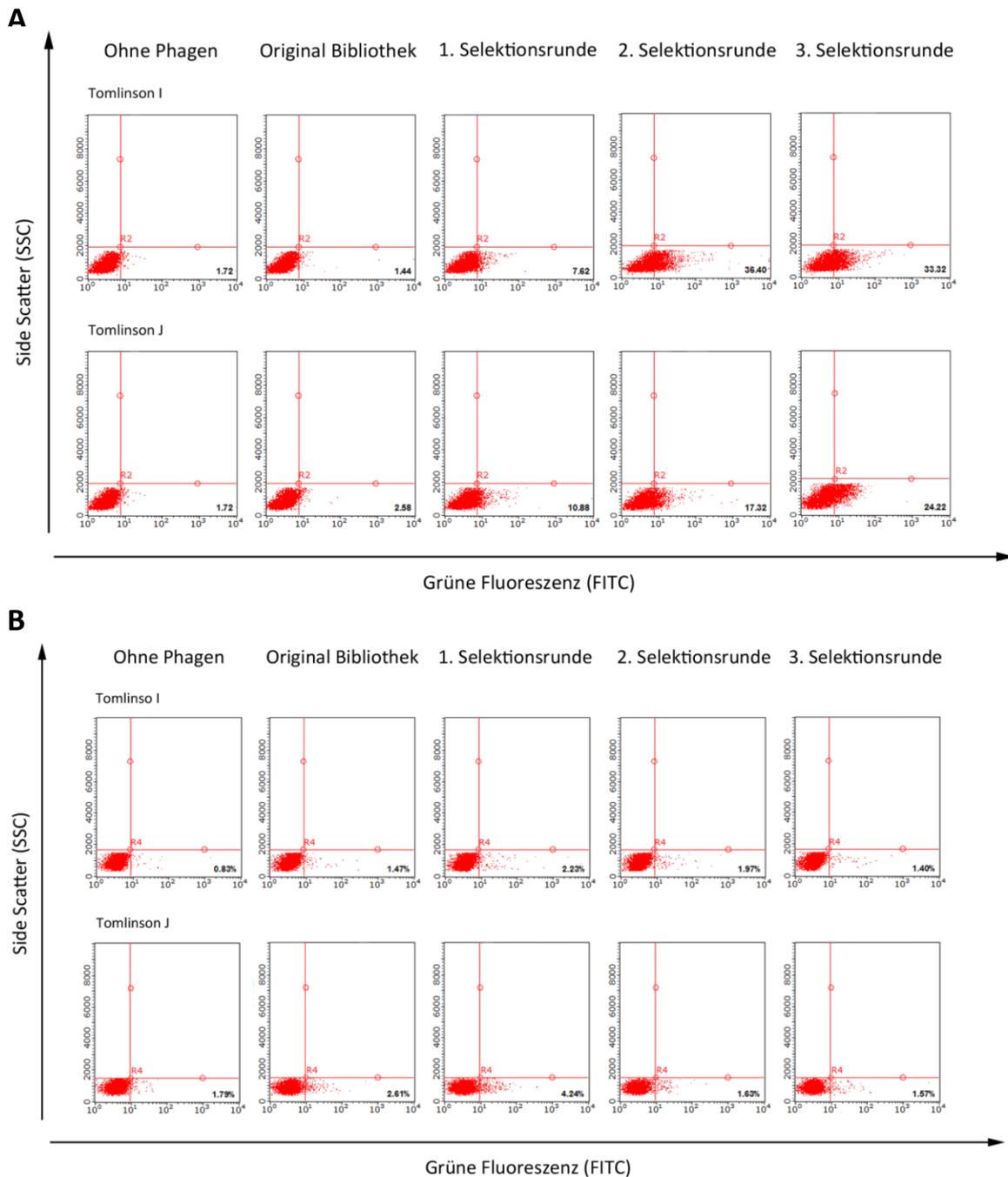


Abb. 13: Anreicherung SCLC-spezifischer Antikörper nach Selektion auf Patientenmaterial 1

Die scFv-Phagenpartikel der Ausgangsbibliotheken Tomlinson I und J und der einzelnen Selektionsrunden wurden im Durchflusszytometer auf ihre Bindeaktivität zu NCI-H82 Tumorzellen (A) und PBMC's (B) untersucht. Ein ansteigendes Fluoreszenzsignal zeigte hierbei eine Anreicherung spezifischer Binder an. Als Negativkontrolle wurden die Zellen ohne Phagen angefärbt. Innerhalb der Punktdiagramme ist das grüne Fluoreszenzsignal gegen den Side Scatter (SSC) aufgetragen, wobei jeder Punkt für eine Zelle steht. Auf den NCI-H82 sieht man bei beiden Bibliotheken einen Anstieg des Fluoreszenzsignals im Vergleich zu den Ausgangsbibliotheken, wohingegen kein Anstieg auf den PBMC's zu sehen ist.

Bei den drei anderen Patienten konnte im Durchflusszytometer keine oder nur eine minimale Anreicherung von SCLC-spezifischen Phagenpartikeln nachgewiesen werden, weshalb von diesen

Selektionen zusätzlich ein polyklonaler Phagen-ELISA (3.4.4) auf immobilisierten NCI-H82 MF, PBMC MF und Plastik durchgeführt wurde (Abb. 14). Bei Patient 2 stieg das Absorptionssignal auf NCI-H82 MF in jeder Runde stetig an, in der dritten Runde war dieses sogar 11-mal höher als das der Ausgangsbibliothek. Außerdem zeigte die erste Selektionsrunde bereits ein hoch signifikant stärkeres Absorptionssignal als die Negativkontrollen ($p = 0,0058$), während die zweite und dritte Runde sogar höchst signifikant stärkere Absorptionssignale aufwiesen ($p < 0,0001$ bzw. $p = 0,0003$). Auch bei Patient 3 und 4 zeigte sich ein starker Anstieg des Absorptionssignals im Vergleich zu der Ausgangsbibliothek, jedoch stieg das Signal auf den Negativkontrollen ebenfalls mit an. Vor allem bei Patient 3 war der Unterschied zwischen dem SCLC-Signal und dem der Kontrollen gering. Hier zeigte nur die erste Selektionsrunde ein signifikant stärkeres Absorptionssignal ($p = 0,0058$). Bei Patient 4 war ab der zweiten Runde ein signifikanter Unterschied zu den Kontrollen zu sehen (2. Runde $p = 0,0003$, 3. Runde $p = 0,0007$). Somit konnte für die Selektionen auf Gewebe von Patient 2, 3 und 4 ebenfalls eine Anreicherung SCLC-spezifischer scFv-Phagenpartikel gezeigt werden.

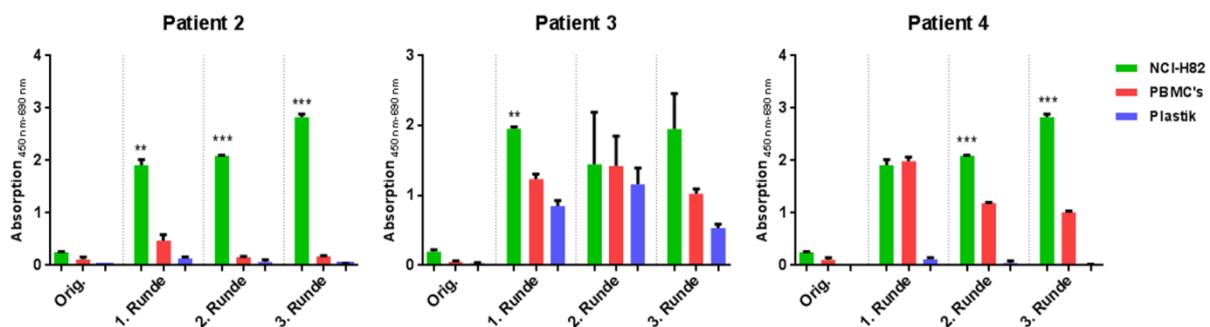


Abb. 14: Anreicherung SCLC-spezifischer Antikörper nach Selektion auf Patientenmaterial 2, 3 und 4

Die Bindeaktivität der scFv-Phagenpartikel von Tomlinson J und der drei Selektionsrunden wurde im polyklonalen Phagen-ELISA auf immobilisierten NCI-H82 (grün) und PBMC (rot) Membranfragmenten, sowie auf Plastik (blau) analysiert. Hierbei konnte ein starker Anstieg des Absorptionssignals auf NCI-H82 MF im Vergleich zur Ausgangsbibliothek dokumentiert werden und vorwiegend ein signifikanter Unterschied zu den Negativkontrollen. Die Balken zeigen das mittlere Signal von Triplikaten mit Standardabweichung an. Die Sternchen stehen für einen hoch (**) oder höchst (***) signifikanten Unterschied im Vergleich zu den Negativkontrollen PBMC's und Plastik.

4.3 Monoklonale Analyse der selektionierten Antikörperfragmente

Nachdem bei allen vier Patienten eine Anreicherung SCLC-spezifischer Antikörperfragmente nachgewiesen werden konnte, wurde daraufhin die Bindeaktivität einzelner Phagenklone untersucht. Hierfür wurde ein monoklonaler Phagen-ELISA (3.4.5) auf NCI-H82 MF durchgeführt. Ein Antikörperklon wurde hierbei als schwach-positiv eingestuft, wenn sein Absorptionssignal 10 - 100-mal über dem Hintergrundsignal (Inkubation ohne scFv-Phagenpartikel) lag, als moderat, wenn das Absorptionssignal zwischen 100 und 200-mal über dem Hintergrund lag und als stark, wenn das Signal über 200-mal größer war. 207 von 440 getesteten Klonen zeigten ein positives Signal (47,1 %), wobei hiervon 162 schwach-, 15 moderat- und 30 stark-positiv waren. Zur Bestätigung der Bindung wurden die positiven Klone in einem weiteren monoklonalen Phagen-ELISA auf NCI-H82 MF untersucht und zusätzlich zur Analyse der Spezifität auf PBMC MF und BSA als irrelevantem Protein. Klone, deren Bindeaktivität auf NCI-H82 MF bestätigt wurde und die keine Kreuzreaktivität zu PBMC MF und BSA zeigten, wurden für die weitere Charakterisierung sequenziert. Hierfür wurden die scFv-Genfragmente mittels Kolonie-PCR amplifiziert und deren Größe von 935 bp auf einem Agarosegel kontrolliert. Nach Aufreinigung der PCR-Produkte und anschließender Sequenzierung wurden die Sequenzen miteinander verglichen, um so eine Einzigartigkeit der Klone zu gewährleisten. Eine nähere Charakterisierung und Bindungsanalyse wurde an 12 einzigartigen Klonen durchgeführt. Die Benennung erfolgte hierbei nach der Position des Klons in den 96-Well Platten. Die nachfolgende Tabelle 12 zeigt die Aminosäuresequenzen der CDR 2 und 3 dieser 12 Klone, wobei die Einteilung der CDR mit Hilfe der IgBLAST Anwendung von NCBI erfolgte [131].

Tabelle 12: Aminosäuresequenzen der CDR 2 und 3 von 12 selektionierten scFv-Klonen

Klon	Variable Regionen der schweren Kette (V_{H-3})		Variable Regionen der leichten Kette (V_{K-1})	
	CDR2	CDR3	CDR2	CDR3
3A	ITHQGS*T	AKRLTRFDY	RAS	QQTYKRPLT
3B	ISQWGLKT	AKGRRKFDY	GAS	QQKQITPFT
6B	ISRRGMRT*	AKKTHKFDY	AAS	QQSYSTPNT
2C	ITRQGGHT	AKKRSPFDY	KAS	QQPKHSPLT
3C	ITHPGA*T	AKRLTQFDY	RAS	QQTYSKTLT
8D	ISRGKHT	AKPGHPFDY	SAS	QQPFLKPET
11D	ITHNGSTT	AKRGLRFDY	KAS	QQLGRYPST
1E	ITNHGQRT	AKLSRKFDY	AAS	QQSYSTPNT
3E	ITRTGAST	AKRRKQFDY	HAS	QQWNNLPAT
4E	ITHPGAYT	AKTSRKFDY	RAS	QQTNNLPLT
6E	ISGQQQHT	AKHRRRFDY	AAS	QQSYSTPNT
3G	ISQSGGLT	AKRGRKFDY	SAS	QQTKKRPRT

*: amber Stopcodon innerhalb der CDR

Mit Ausnahme von Klon 4E wiesen alle Antikörperklone ein amber Stopcodon innerhalb der DNA-Sequenz der variablen schweren Kette auf. Die Stopcodons lagen hierbei nur bei drei Klonen in der

CDR2. Diese wurden für die Herstellung löslicher scFv's mittels ortsgerichteter Mutagenese (3.4.6) entfernt. Da sich das Stopcodon bei allen Klonen an unterschiedlichen Stellen befand, wurden für jeden Klon individuelle Primer für die Umwandlung des TAG-Codons in CAG entworfen. Die Mutagenese wurde mittels Sequenzierung überprüft. Bei allen Klonen konnte erfolgreich das Stopcodon in die Aminosäure Glutamin umgewandelt werden. Eine Ausnahme hiervon bildeten die Klone 3C und 8D, welche sich trotz mehrfachen Versuchs nicht ummutieren ließen. Diese Klone wurden daher für weitere Analysen nicht mehr berücksichtigt.

Abb. 15 zeigt die Absorptionswerte der 12 Klone im monoklonalen Phagen-ELISA. Alle 12 Klone zeigten hierbei Bindeaktivität zu NCI-H82 Membranfragmenten und keine Bindung zu PBMC MF oder BSA. Der Unterschied zu den Negativkontrollen war bei allen Klone signifikant. Die höchsten Absorptionssignale wurden hierbei von den Klonen 3B, 11D und 3G dokumentiert mit Werten von $1,95 \pm 0,10$; $1,55 \pm 0,09$ und $2,10 \pm 0,05$. Im Vergleich dazu lagen die Absorptionssignale von 3C, 8D und 4E nur bei $0,29 \pm 0,01$; $0,20 \pm 0,02$ und $0,15 \pm 0,02$.

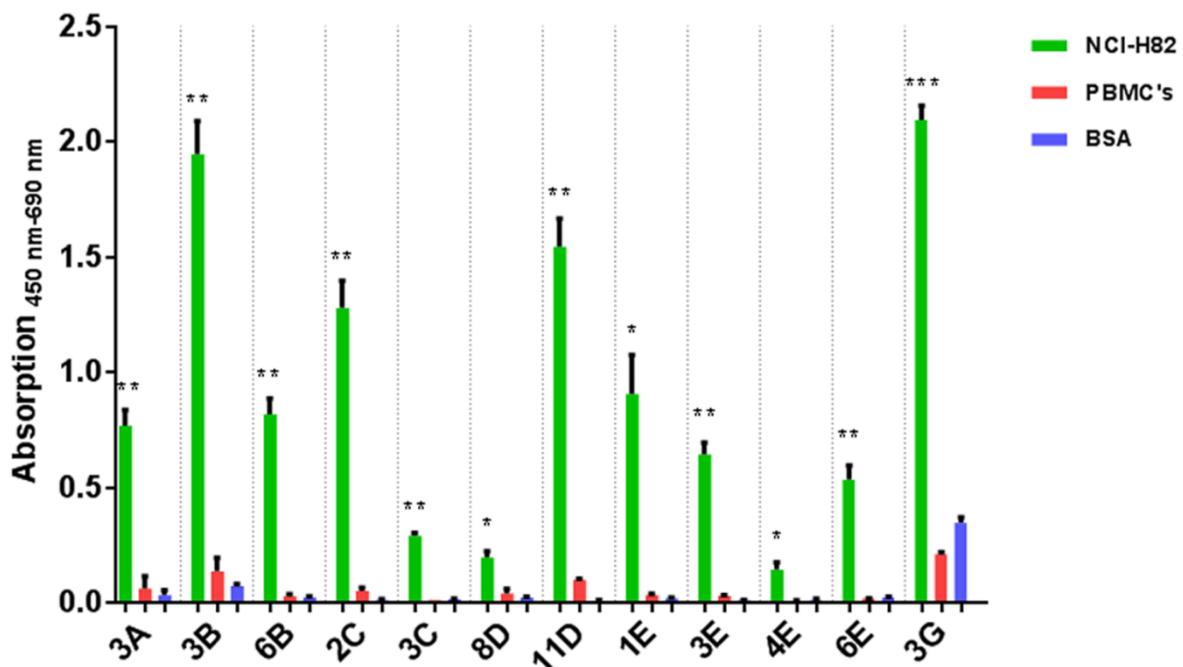


Abb. 15: SCLC-spezifischer Bindungsnachweis von 12 ausgewählten Klonen auf Phagenebene

Die Bindeaktivität von 12 einzigartigen Klonen wurde in einem monoklonalen Phagen-ELISA auf immobilisierten Membranfragmenten von NCI-H82 (grün) und PBMC's (rot), sowie auf BSA (blau) untersucht. Hierbei zeigte sich bei allen Klonen ein signifikanter Unterschied des Absorptionssignals auf NCI-H82 im Vergleich zu den Negativkontrollen PBMC's und Plastik. Dargestellt sind die Mittelwerte von Triplikaten mit entsprechender Standardabweichung. * = signifikant, ** = hoch signifikant, *** = höchst signifikant

4.4 Herstellung und Analyse löslicher scFv-Fc Fusionsproteine

Nachdem die SCLC-spezifische Bindeaktivität von einzelnen Klonen auf Phagenebene bestätigt wurde, wurden im nächsten Schritt lösliche Antikörperfragmente hergestellt und untersucht.

4.4.1 Herstellung der scFv-Fusionsproteine

Für die Expression von scFv-Fc Fusionsproteinen wurden die 10 Klone, bei denen das Stopcodon erfolgreich ummutiert wurde, in den eukaryotischen Expressionsvektor pMS2 umkloniert. Dieser Vektor enthält einen murinen IgG2a Fc-Teil, der einen Nachweis der hergestellten Antikörper über Standard anti-Maus Sekundärantikörper ermöglicht. Die erfolgreiche Anwendung von Fc Fusionsproteinen konnte bereits in zahlreichen Immunoassays wie ELISA [132], Immunhistochemie [133], Immunfluoreszenz [134] und in der Durchflusszytometrie [135] gezeigt werden. Da der Fc-Teil aus der CH₂, der CH₃ und der Hinge-Region besteht, entstanden durch die Verknüpfung der Hinge-Regionen über Disulfidbrücken Fc Fusionsprotein-Dimere, so dass die scFv-Fc Fusionsproteine zwei Antigenbindungsstellen enthielten (bivalente Bindeaktivität). Die scFv-Sequenzen wurden für die Umwandlung mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Sfi*I und *Not*I geschnitten und im Leseraster N-terminal oberhalb des Fc-Teils kloniert, so dass bei Expression ein scFv-Fc Fusionprotein entstand. Der korrekte Einbau des scFv in pMS2 wurde mittels Sequenzierung verifiziert. Alle Klone außer Klon E4 konnten erfolgreich in den pMS2 Vektor umkloniert werden. Klon E4 wurde daher für weitere Untersuchungen nicht mehr berücksichtigt. Nach Amplifikation der Vektoren in Bakterien und Aufreinigung über Minipräparationen wurden die Vektoren in HEK 293T Zellen mittels Lipofektion transfiziert. Die Transfektionseffizienz konnte über die grüne Fluoreszenz des kotranslatierten Reporterproteins GFP im Durchflusszytometer überprüft werden, nicht transfizierte HEK 293T Zellen dienten hierbei als Negativkontrolle. Bei allen Transfektionen lag die Effizienz zwischen 85 und 95 % (s. Abb. 16), d. h. ein Großteil der Zellen hatte den Vektor aufgenommen. Auch bei wiederholten Transfektionen lag die Effizienz in diesem Bereich. Für die Produktion größerer Mengen an scFv-Fc Fusionsproteinen wurden die transfizierten HEK Zellen unter Selektionsdruck in Medium mit 100 µg/ml Zeocin kultiviert, wodurch nur die pMS2-enhaltenden Zellen überlebten. Nicht transfizierte HEK Zellen starben unter diesen Selektionsbedingungen innerhalb weniger Tage ab. Während der Produktion der Fusionsproteine wurden die Zellen regelmäßig im Durchflusszytometer auf Vorhandensein des pMS2 Vektors überprüft. Hierbei waren nahezu 100 % der Zellen GFP positiv, so dass alle Zellen unter Selektionsdruck Fusionsproteine exprimierten.

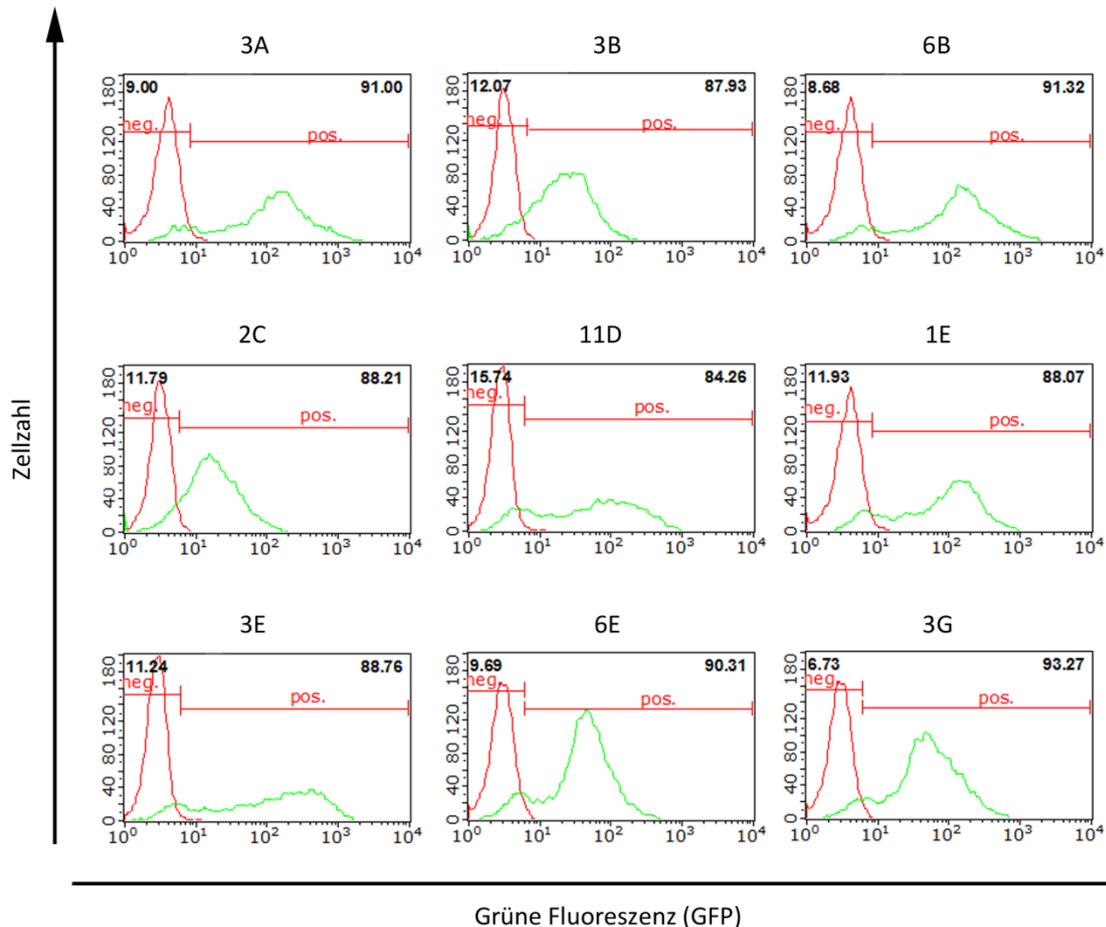


Abb. 16: Transfektionsnachweis von HEK 293T Zellen zur Produktion von Fc-Fusionsproteinen

Zur Produktion von Fc-Fusionsproteinen wurden die scFv Binder in den Expressionsvektor pMS2 kloniert und in HEK 293T Zellen transfiziert. Durch das im Vektor enthaltene grün-fluoreszierende Protein (eGFP) wurde die Transfektionseffizienz im Durchflusszytometer bestimmt (grüner Graph), als Negativkontrolle dienten nicht-transfizierte HEK Zellen (roter Graph). Die Histogramme zeigen das grüne Fluoreszenzsignal gegen die Zellzahl. Die Anzahl an GFP positiven Zellen lag bei allen Transfektionen zwischen 85 und 95 %.

Mit Hilfe einer Coomassie-Färbung (3.3.5) und eines Western Blots (3.3.6) wurde die Expression der scFv-Fc Fusionsproteine in den Überständen der transfizierten Zellen überprüft. In der Coomassie-Färbung waren mehrere, unterschiedlich dominante Banden zu sehen (Abb. 17 A). Diese stammten von den Fusionsproteinen, mit einer erwarteten Größe von 57 kDa, und den im Medium enthaltenen Proteinen. Zwischen den transfizierten Überständen und dem nicht-transfizierten Überstand (NT) war jedoch kein Unterschied zu sehen, weshalb die Fusionsproteine nicht eindeutig identifiziert werden konnten. Im Western Blot konnten die Fusionsproteine jedoch durch einen anti-Maus Sekundärantikörper spezifisch nachgewiesen werden (Abb. 17 B).

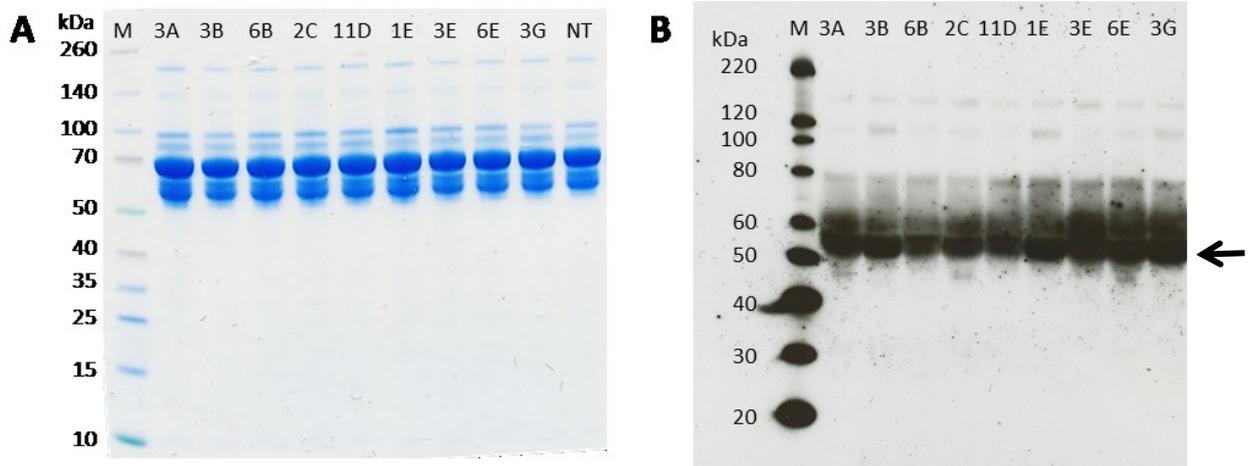


Abb. 17: Nachweis der scFv-Fc Fusionsproteine mittels Coomassie-Färbung und Western Blot

Die Herstellung der scFv Fusionsproteine in transfizierten HEK Zellen wurde mit Hilfe einer Coomassie-Färbung (A) und einem Western Blot (B) überprüft. In der Coomassie-Färbung konnten auf Grund der Medienbestandteile die Fusionsproteine nicht eindeutig identifiziert werden. Hier wurde kein Unterschied zu Zellkulturüberstand von nicht-transfizierten HEK Zellen dokumentiert. Im Western Blot konnten die scFv-Fc jedoch durch einen HRP-markierten anti-Maus Sekundärantikörper spezifisch nachgewiesen werden. Der Pfeil zeigt die Bande bei der erwarteten Größe von 57 kDa an. kDa = Kilo Dalton; M = Proteinmarker; NT = nicht-transfizierter Zellkulturüberstand

4.4.2 Bindungsanalyse der scFv-Fc Fusionsproteine

Nachdem alle 9 scFv-Fc Fusionsproteine erfolgreich in HEK Zellen hergestellt wurden, sollte die spezifische Bindeaktivität der löslichen Antikörperfragmente untersucht werden. Hierfür wurden die Zellkulturüberstände im monoklonalen ELISA auf immobilisierten MF von NCI-H82 und PBMC's, sowie auf BSA eingesetzt (3.5.2). Hierbei zeigten die Klone 3B, 6B, 1E, 3E und 6E eine starke Bindung zu den NCI-H82 MF mit Absorptionswerten zwischen $0,55 \pm 0,01$ von 6E und $0,91 \pm 0,01$ von 6B (Abb. 18). Die Absorptionswerte waren alle über 200-fach höher als die der Hintergrundkontrolle (Färbung ohne scFv-Fc). Es wurde keine Kreuzreaktivität zu PBMC MF oder BSA nachgewiesen. Bei diesen fünf Klonen bestand ein höchst signifikanter Unterschied zwischen den Absorptionswerten auf NCI-H82 und PBMC's. Der Klon 2C zeigte ebenfalls Bindeaktivität zu NCI-H82 MF bei nur minimalem Absorptionssignal auf PBMC MF und BSA, jedoch lag hier kein signifikanter Unterschied vor. Die Klone 3A, 11D und 3G zeigten hingegen keine oder nur eine minimale Bindung zu den NCI-H82 MF, wohingegen zuvor auf Phagenebene eine starke Bindung detektiert wurde (s. Abb. 15). Bei den Klonen 6B, 1E, 3E und 6E waren die gemessenen Absorptionswerte genau so stark wie im monoklonalen Phagen-ELISA. Dagegen war das Absorptionssignal von 3B als Fc Fusionsprotein 3,4-fach geringer als auf Phagenebene (1,95 als Phage und 0,58 als Fc Fusionsprotein) und bei 2C sogar 7,1-fach geringer (1,28 als Phage und 0,18 als Fc Fusionsprotein).

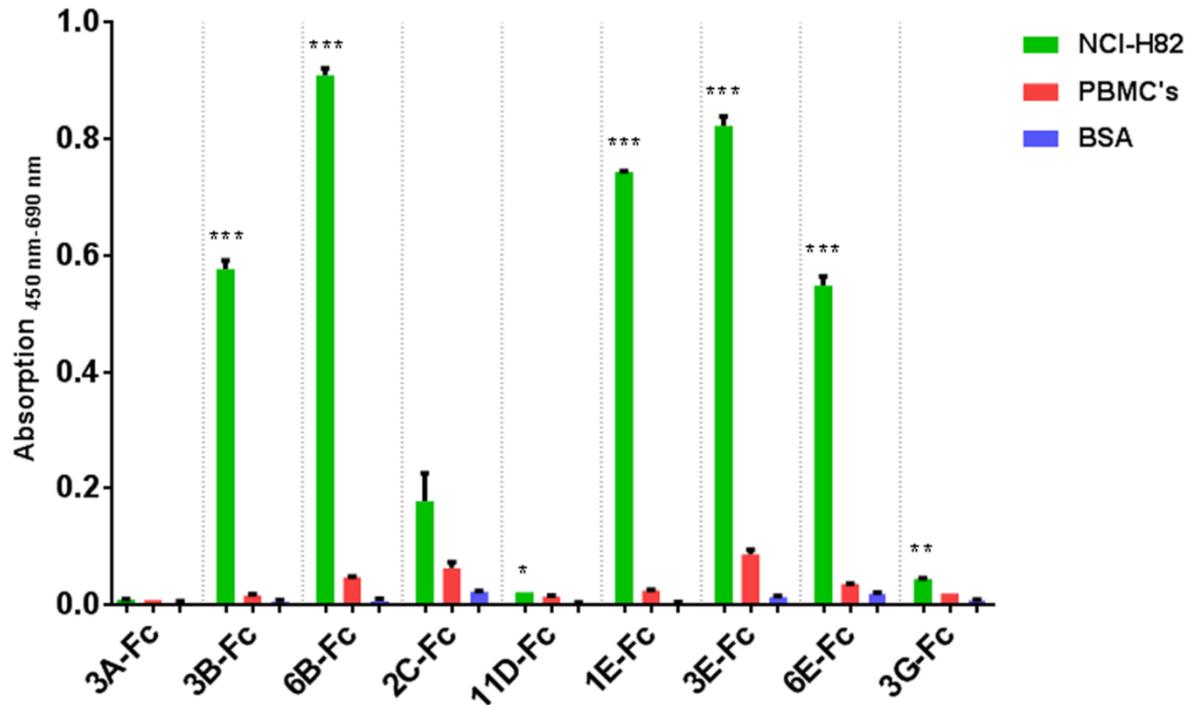
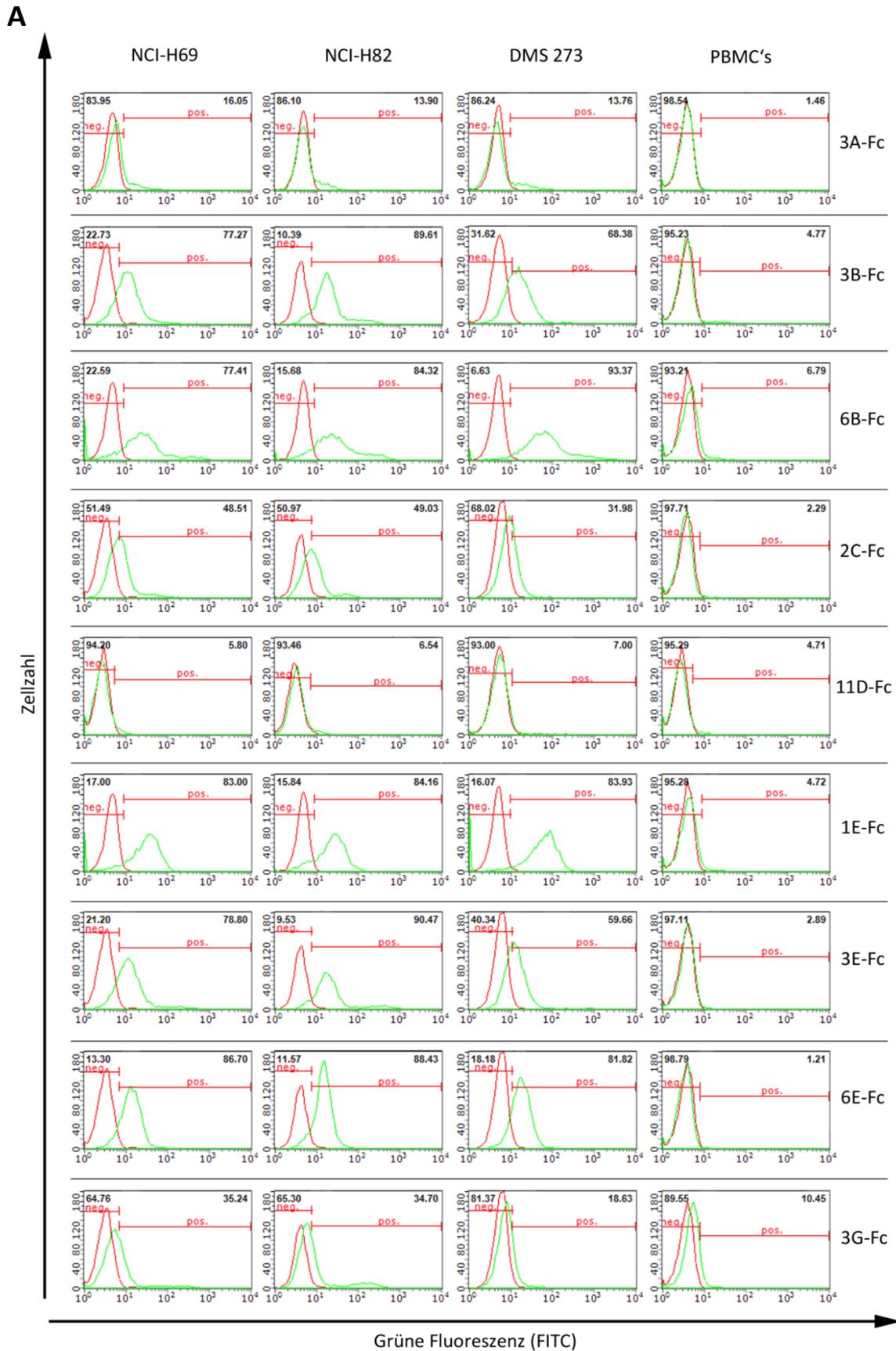


Abb. 18: SCLC-spezifische Bindeaktivität der scFv-Fc Fusionsproteine im ELISA

Nach Herstellung der scFv-Fc Fusionsproteine in eukaryotischen Zellen wurde die Bindeaktivität im ELISA auf immobilisierten NCI-H82 MF (grün), PBMC MF (rot) und BSA (blau) untersucht. Hierbei zeigten die Klone 3B, 6B, 1E, 3E und 6E eine starke Bindung zu NCI-H82 MF und keine Kreuzreaktivität zu PBMC MF oder BSA. Der Klon 2C zeigte ebenfalls eine Bindung zu NCI-H82 MF, jedoch wesentlich schwächer. Dargestellt ist die mittlere Absorption von Doppelwerten mit Standardabweichung. * = signifikant, ** = hoch signifikant, *** = höchst signifikant

Des Weiteren wurde die Bindung auf vitalen SCLC Zelllinien im Durchflusszytometer untersucht. Hierfür wurden die SCLC Zelllinien NCI-H69, NCI-H82 und DMS 273 mit den HEK Überständen der 9 scFv-Fc Fusionsproteine inkubiert, wobei zusätzlich PBMC's als Negativkontrolle gefärbt wurden. Bei allen Messungen diente Kulturüberstand von nicht-transfizierten HEK Zellen als Hintergrundkontrolle des Sekundärantikörpers. Bei Bindung durch das scFv-Fc Fusionsprotein wurden die Zellen nach Zugabe des Sekundärantikörpers fluoreszierend markiert, wodurch es zu einer Verschiebung des grünen Fluoreszenzsignals kam. Das Signal der Hintergrundkontrolle wurde bei der Auswertung in Relation zu den Signalen der Fusionsproteine gesetzt (Abb. 19 A). Die Binder wurden anhand der Fluoreszenzverschiebung in schwache, moderate und starke Binder unterteilt. Hierbei galt ein Binder als schwach wenn die Verschiebung zwischen 20 - 50 % lag, als moderat bei 50 - 70 % und als stark bei einer Verschiebung von > 70 %. Bei den Binder 3B, 6B, 1E, 3E und 6E handelte es sich demnach um starke Binder und bei 2C und 3G um schwache Binder. 3A und 11D zeigten keine Bindeaktivität zu den drei SCLC Zelllinien. Keines der Fusionsproteine zeigte eine Bindung zu den PBMC's. Die Messungen im Durchflusszytometer bestätigen die Ergebnisse des monoklonalen ELISA's. Zur

Verdeutlichung sind die Messergebnisse der Durchflusszytometrie in Abb. 19 B als Balkendiagramm dargestellt.



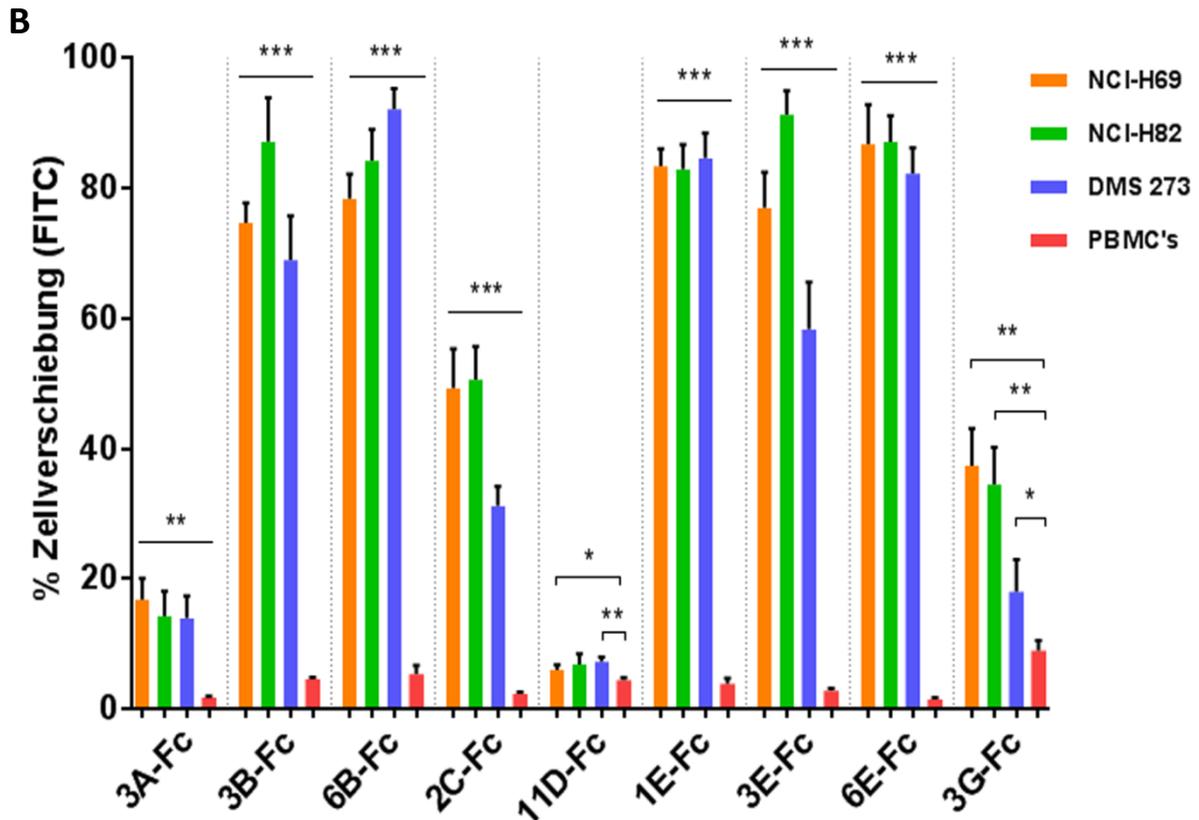


Abb. 19: SCLC-spezifische Bindeaktivität der scFv-Fc Fusionsproteine im Durchflusszytometer

Die Bindung der 9 scFv-Fc Fusionsproteine auf den SCLC Zelllinien NCI-H69, NCI-H82 und DMS 273 wurde im Durchflusszytometer untersucht. Als Negativzelllinie wurden zusätzlich PBMC's gefärbt. Die Bindung wurde mittels goat anti mouse-FITC Sekundärantikörper detektiert, Kulturüberstand von nicht-transfizierten HEK Zellen diente als Hintergrundkontrolle. **A:** Die Histogramme zeigen die grüne Fluoreszenzintensität gegen die Zellzahl, wobei der rote Graph das Signal des nicht-transfizierten HEK Überstands zeigt (Hintergrundkontrolle) und der grüne Graph des entsprechenden scFv-Fc enthaltenden Überstands. **B:** Darstellung der Durchflusszytometrie-Ergebnisse als Balkendiagramm. Die Balken geben die Mittelwerte der prozentualen Zellverschiebung des grünen Fluoreszenzsignals von Triplikaten mit Standardabweichung an. Signifikante Unterschiede zwischen den SCLC Zelllinien und der Negativkontrolle sind durch Sternchen angezeigt. * = signifikant, ** = hoch signifikant, *** = höchst signifikant

Hierbei zeigten die Fusionsproteine 3B, 6B, 1E, 3E und 6E eine starke Bindung zu den drei SCLC-Zelllinien. Bei 2C und 3G wurde eine schwache Bindung zu SCLC detektiert, wohingegen 3A und 11D keine Bindung zeigten. Zusätzlich wurde bei keinem der Antikörper eine Bindung zu den PBMC's dokumentiert.

4.4.3 Untersuchung des Internalisierungsverhaltens

Nachdem über die *On Slide* Selektion SCLC-spezifische Binder generiert werden konnten, wurde eine mögliche therapeutische Anwendung der selektionierten scFv Antikörper untersucht. Hierfür sollten diese an eine verkürzte Form des *Pseudomonas* Exotoxin A (ETA') genetisch fusioniert und als sogenannte rekombinante Immuntoxine hergestellt werden. Entscheidend für eine zytotoxische Wirkung von Immuntoxinen ist die zelluläre Aufnahme (Internalisierung) der Immuntoxine durch die

Zielzelle [67]. Daher wurde zunächst das Internalisierungsverhalten der scFv-Fc Fusionsproteine 3B, 3E und 6E mittels Durchflusszytometrie und im Konfokalmikroskop untersucht, da die Herstellung von Immuntoxinen nur bei internalisierenden Antikörpern sinnvoll ist.

Bei der Durchflusszytometrie-basierten Untersuchung wurden DMS 273 Zellen mit den scFv-Fc Fusionsproteinen zunächst bei 4 °C inkubiert. Bei dieser Temperatur ist der Stoffwechsel der Zellen herunterreguliert, so dass eine endozytotische Aufnahme der Antikörper nicht möglich ist [136, 137]. Nachdem die nicht gebundenen Antikörper durch Waschen entfernt wurden, erfolgte eine weitere Inkubation in Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO₂ Begasung im Brutschrank für 15, 30, 60, 120 bzw. 240 min. Hierdurch sollte eine rezeptorvermittelte Endozytose der gebundenen scFv-Fc's ermöglicht werden. Parallel dazu erfolgte auch eine Inkubation durchgehend bei 4 °C, wodurch eine Internalisierung verhindert werden sollte. Anschließend erfolgte die Detektion der scFv-Fc's mit Hilfe eines gam-FITC Sekundärantikörpers, bevor die Zellen im Durchflusszytometer gemessen wurden. Der Median der Fluoreszenzintensität der durchgehend bei 4 °C inkubierten Zellen diente bei der Analyse als Referenzwert und wurde für die Auswertung auf 100 % gesetzt. Alle Messungen erfolgten als Triplikate. Abb. 20 zeigt die Ergebnisse der Durchflusszytometrie. Nach 15 min nahm die Fluoreszenzintensität von 3B bereits um 65 % ab. Hier kam es zu einer schnellen Aufnahme des gebundenen Fusionsproteins durch die Zielzellen und somit zur Abnahme des Fluoreszenzsignals, da der gam-FITC Sekundärantikörper nicht an die internalisierten scFv's binden konnte. Zu einer 55 % Intensitätsabnahme von 3E kam es nach 60 min, wohingegen die Fluoreszenzintensität von 6E erst nach 240 min unter 50 % des Ausgangswerts gesunken war. 6E wurde demnach wesentlich langsamer internalisiert als die beiden anderen Binder.

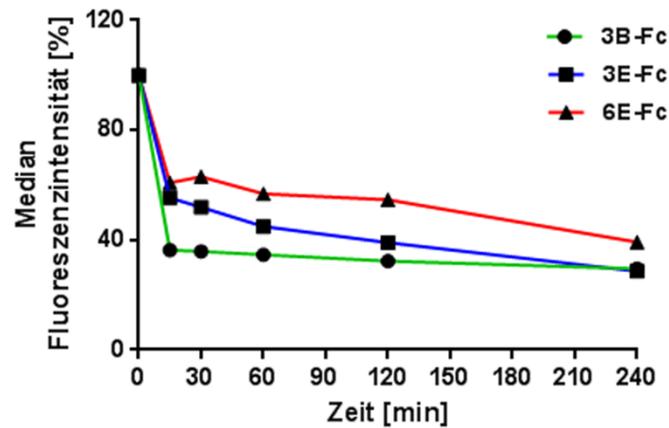


Abb. 20: Internalisierungsverhalten der scFv-Fc's 3B, 3E und 6E im Durchflusszytometer

DMS 273 Zellen wurden mit den scFv-Fc Fusionsproteinen 3B, 3E und 6E inkubiert und anschließend für 15, 30, 60, 120 bzw. 240 min in Kulturmedium im Brutschrank inkubiert, bevor die Detektion mittels gam-FITC erfolgte. Eine Abnahme der Fluoreszenzintensität zeigte hierbei die Internalisierung der Fusionsproteine durch die Zielzellen an. 3B wurde bereits nach 15 min zu 65 % internalisiert und 3E zu 55 % nach 60 min. 6E wurde dagegen erst nach 240 min zu über 50 % aufgenommen. Dargestellt sind die Mittelwerte von Duplikaten.

Für die Untersuchung des Internalisierungsverhaltens im Konfokalmikroskop wurden DMS 273 Zellen auf einem 8-Kammer Zellkulturobjektträger ausplattiert und 30 min bei 4 °C mit scFv-Fc enthaltendem HEK Überstand inkubiert. Der Nachweis der Fc Fusionsproteine erfolgte anschließend mit einem gam-FITC Sekundärantikörper für 2 h bei 4 °C oder 37 °C. Die Inkubation bei 37 °C sollte eine Internalisierung der gebundenen Fusionsproteine durch die Zielzellen ermöglichen, wohingegen der Stoffwechsel der Zellen bei 4 °C so stark abgesenkt wurde, dass keine Internalisierung möglich war. Als Kontrolle wurden zusätzlich Zellen mit nicht-transfiziertem HEK Überstand inkubiert und mit gam-FITC gefärbt. Anschließend wurden die Zellkerne mit DAPI gegengefärbt und die Zellen unter dem Konfokalmikroskop analysiert (Abb. 21). Die Inkubation bei 37 °C führte zu einer Aufnahme der Antikörper durch die Zellen, weshalb hierbei intrazelluläre Signale beobachtet werden konnten. Im Vergleich dazu kam es zu einer reinen Oberflächenfärbung durch die Inkubation bei 4 °C. Wie schon im Durchflusszytometer wurde eine starke Internalisierung der Antikörper 3B und 3E detektiert, wohingegen 6B nur ineffizient durch die Zielzellen aufgenommen wurde.

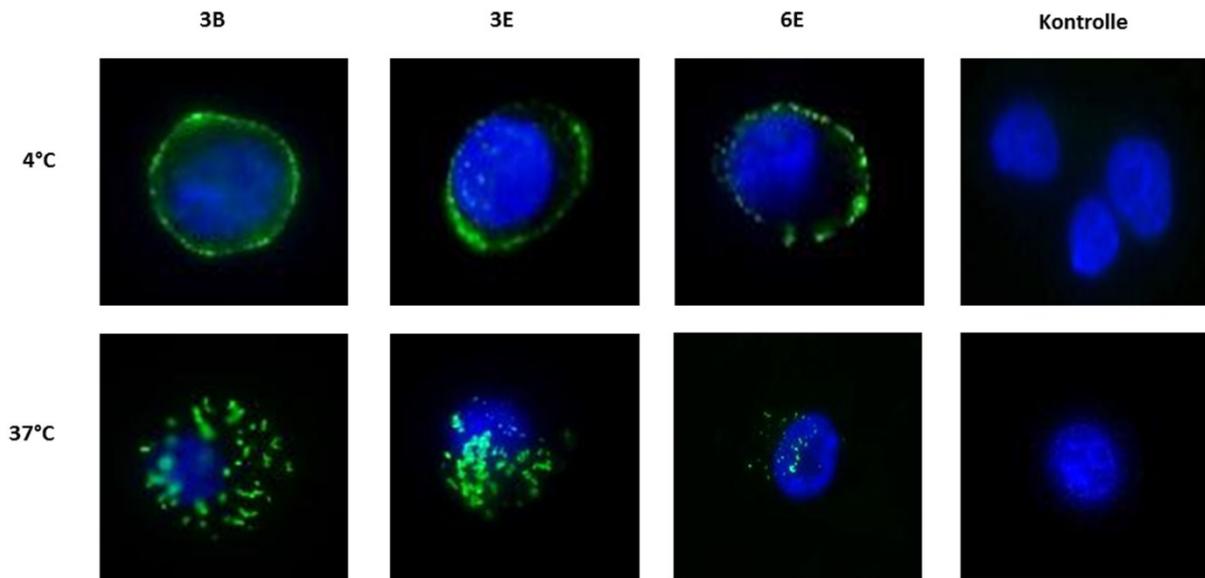


Abb. 21: Internalisierungsverhalten der scFv-Fc's 3B, 3E und 6E im Konfokalmikroskop

Zur Untersuchung des Internalisierungsverhaltens der scFv-Fc Fusionsproteine 3B, 3E und 6E im Konfokalmikroskop wurden DMS 273 Zellen auf einem 8-Kammer Zellkulturobjektträger ausgesät und 30 min bei 4 °C mit scFv-Fc enthaltendem HEK Überstand inkubiert. Anschließend erfolgte die Detektion mit Hilfe eines gam-FITC Sekundärantikörpers für 2 h bei 4 °C oder 37 °C. Als Kontrolle wurden Zellen mit nicht-transfiziertem HEK Überstand und gam-FITC gefärbt. Die Inkubation bei 4 °C führte zu einer Oberflächenfärbung der Zellen, wohingegen bei der Inkubation bei 37 °C eine Internalisierung der Antikörper beobachtet wurde. Die Antikörper 3B und 3E zeigten hierbei ein starkes Internalisierungsverhalten. Im Vergleich dazu wurde 6E nur ineffizient von den Zellen aufgenommen.

Vergrößerung: 63-fach

4.5 Herstellung und Analyse von Fab-Antikörperfragmenten

Die Bindung der scFv-Fc Fusionsproteine konnte sowohl im ELISA auf funktionalen SCLC Membranfragmenten, als auch in der Durchflusszytometrie auf vitalen SCLC Zelllinien verifiziert werden. Jedoch zeigten die Fc Fusionsproteine in der Immunhistochemie eine unspezifische Hintergrundfärbung, wie auch schon von anderen Arbeitsgruppen beschrieben [138, 139]. Zusätzlich wurde bei einigen Fab-Fragmenten eine höhere Affinität im Vergleich zum korrespondierenden scFv [140, 141] und eine höhere thermodynamische Stabilität [142] beobachtet. Daher wurden die scFv's in Fab-Antikörperfragmente umgewandelt und deren Bindeaktivität untersucht.

4.5.1 Herstellung der Fab-Antikörperfragmente

Für die Umwandlung der scFv's in Fab-Fragmente wurden die fünf stärksten Binder 3B, 6B, 1E, 3E und 6E ausgewählt. Außerdem wurde der Binder 3A umgewandelt, welcher am Phagenpartikel eine Bindung zu SCLC zeigte, als Fc Fusionsproteine jedoch nicht. Hierdurch sollte überprüft werden, ob

durch die Änderung des Antikörperformats die auf Phageneben detektierte Bindeaktivität bestätigt werden kann.

Zunächst mussten die schweren und leichten Ketten der scFv's zur Anlagerung der entsprechenden Restriktionsschnittstellen mittels PCR amplifiziert werden. Nach erfolgreicher Amplifikation wurden die aufgereinigten PCR-Produkte zur Konstruktion der Fab-Fragmente in den Vektor pGAL kloniert. Für die Herstellung der Fab-Fragmente wurden die Sequenzen aus pGAL in den prokaryotischen Expressionsvektor pMT2 kloniert. Alle Klonierungen wurden auf Vorhandensein des Inserts im korrekten Leseraster mittels Sequenzierung überprüft.

Nach der prokaryotischen Herstellung wurden die Fab-Fragmente über das enthaltene His₆ Tag mit Hilfe von Ni-NTA Säulen aufgereinigt (3.3.2), aufkonzentriert und umgepuffert (3.3.3), sowie der Proteingehalt über einen BCA-Assay bestimmt (3.3.7). Die Konzentrationen lagen hierbei im Bereich von 150 - 250 µg/ml. Die Produktion und Aufreinigung wurden durch eine Coomassie-Färbung (3.3.5) und einen Western Blot (3.3.6) kontrolliert. Durch die Coomassie-Färbung wurde die Reinheit der Fab-Fragmente überprüft und durch den Western Blot die Proteinidentität verifiziert. In der Coomassie-Färbung (Abb. 22 A) zeigte sich, dass die Fab-Fragmente trotz Aufreinigung noch bakterielle Proteine enthielten, im Western Blot (Abb. 22 B) konnten die Fab-Fragmente spezifisch nachgewiesen werden. Hierbei lag die Bande der schweren und leichten Kette nach der Denaturierung bei der erwarteten Größe von 26 kDa.

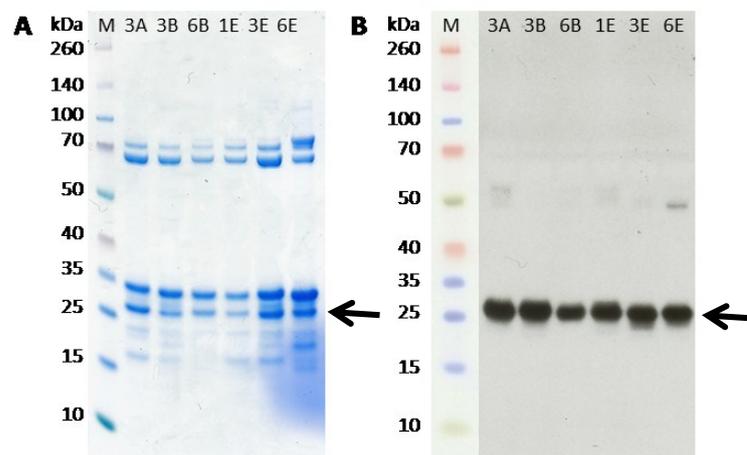


Abb. 22: Nachweis der Fab-Fragmente mittels Coomassie-Färbung und Western Blot

Die Herstellung und Aufreinigung der Fab-Antikörperfragmente wurde mit Hilfe einer Coomassie Färbung (A) und eines Western Blots (B) überprüft. In der Coomassie Färbung sind trotz Aufreinigung noch bakterielle Proteine zu sehen. Im Western Blot konnten die Fab-Fragmente durch einen anti-Fab HRP Antikörper spezifisch nachgewiesen werden. Durch einen Proteinstandardmarker konnte die korrekte Größe der denaturierten schweren und leichten Kette bei ca. 26 kDa ermittelt werden. Der Pfeil zeigt die entsprechende Bande an.

kDa = Kilo Dalton; M = Proteinmarker

4.5.2 Bindungsanalyse der Fab-Antikörperfragmente

Nach erfolgreicher Herstellung der Fab-Antikörperfragmente wurde die Bindeaktivität auf den SCLC Zelllinien NCI-H82 und DMS 273 im Durchflusszytometer analysiert (Abb. 23). Zusätzlich wurden zur Verifizierung der Spezifität PBMC's, NK92-C1 und NALM-6 als Negativkontrollzellen verwendet. Außerdem wurde auch immer eine Sekundärantikörperkontrolle (Färbung der Zellen ohne Fab-Fragment) zur Bestimmung des Hintergrundsignals mitgeführt. Der Bindungsnachweis erfolgte mit einem biotinylierten anti-Fab Antikörper und PE markiertem Streptavidin. Anhand der Verschiebung des Fluoreszenzsignals wurden die Fab-Fragmente hierbei wie schon die scFv-Fc Fusionsproteine in schwache (20 - 50 % Verschiebung), moderate (50 - 70 % Verschiebung) und starke (> 70 % Verschiebung) Binder unterteilt. Nach dieser Einteilung handelte es sich bei 3B und 3E um starke Binder, bei 1E um einen moderaten Binder und bei 6B und 6E um schwache Binder. 3A zeigte wie auch schon als scFv-Fc Fusionsproteine keine Bindeaktivität, demnach konnte die gemessene Bindeaktivität am Phagenpartikel auch als Fab-Antikörperfragment nicht bestätigt werden. Außerdem nahm die Bindeaktivität von 6B und 6E als Fab-Fragmente im Vergleich zu den Fc Fusionsproteinen deutlich ab (6B von 85 % als Fc Fusionsprotein auf 41 % als Fab-Fragment und 6E von 85 % als Fc Fusionsprotein auf 19 % als Fab-Fragment). Dennoch zeigten alle 6 Fab-Fragmente auf den SCLC Zelllinien einen signifikanten Unterschied im Vergleich zu den Negativkontrollzellen.

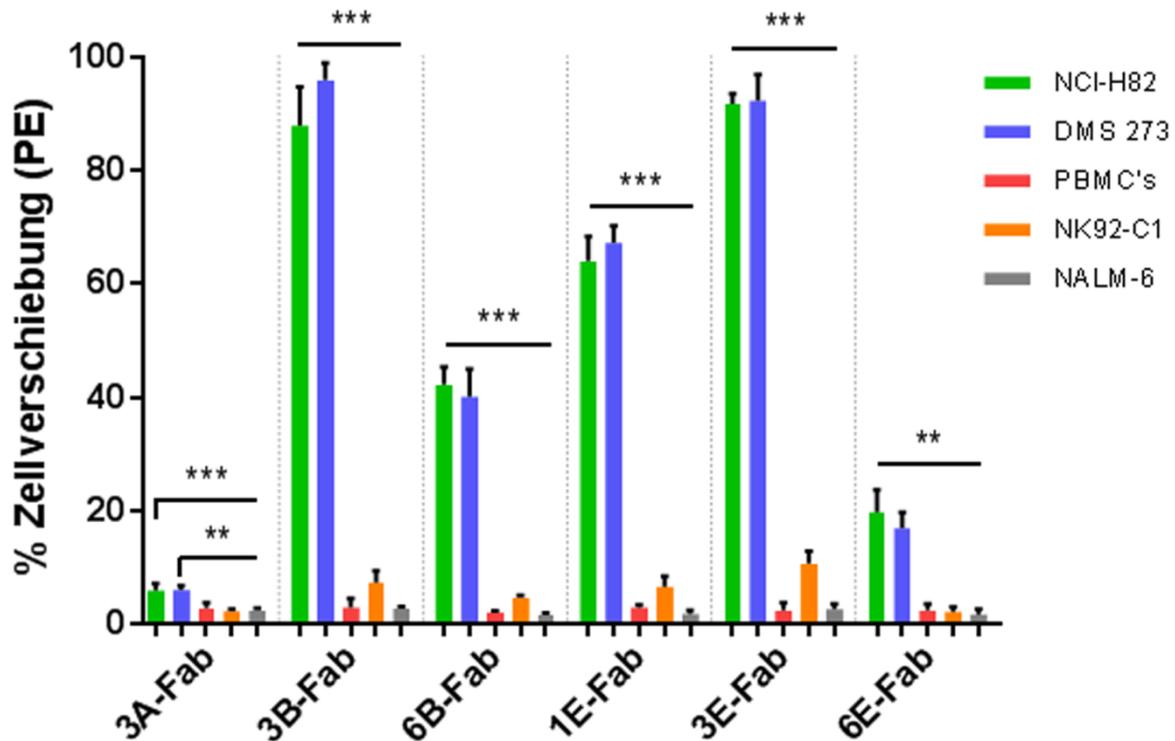


Abb. 23: SCLC-spezifische Bindeaktivität der Fab-Fragmente im Durchflusszytometer

Die Bindung der 6 Fab-Fragmente wurde im Durchflusszytometer auf den SCLC Zelllinien NCI-H82 und DMS 273 überprüft. Als Negativkontrollzellen wurden PBMC's, NK92-C1 und NALM-6 gefärbt und als Hintergrundkontrolle die Zellen ohne Primärantikörper. Der Bindungsnachweis erfolgte über einen biotinylierten anti-Fab Antikörper und PE gekoppeltes Streptavidin. Hierbei zeigten die Fab-Fragmente 3B und 3E eine starke Bindung zu den SCLC Zellen und 1E eine moderate Bindung. Auch 6B und 6E zeigten Bindeaktivität, jedoch deutlich schwächer, wohingegen bei 3A keine Bindung dokumentiert wurde. Die prozentuale Verschiebung des gelben Fluoreszenzsignals der Zellen ist als Balkendiagramm dargestellt. Die Balken geben die Mittelwerte von Triplikaten mit Standardabweichung an. Die Signifikanz wurde zwischen dem Signal der SCLC Zelllinien und der Negativkontrollzellen berechnet. ** = hoch signifikant, *** = höchst signifikant

4.5.3 Analyse der Trypsinsensitivität der Antigene

Nach erfolgreichem Bindungsnachweis der Fab-Fragmente auf NCI-H82 und DMS 273 Zellen, wurde als nächstes überprüft, ob es sich bei den Zielantigenen der Fab-Fragmente 3B, 3E und 6E um trypsin-sensitive Oberflächenproteine handelt, um so die Zielstruktur der Binder eingrenzen zu können. Hierfür wurden DMS 273 Zellen vor der Färbung mit den Fab-Fragmenten für 15 min mit Trypsin-EDTA inkubiert, wodurch die Oberflächenproteine proteolytisch abgebaut werden sollten. Parallel dazu wurden DMS 273 Zellen für 15 min mit PBS inkubiert. Diese Zellen dienten bei der anschließenden Färbung als nicht-trypsinierte Kontrolle. Nach dem proteolytischen Verdau und Inkubation mit den Fab-Fragmenten, erfolgte der Bindungsnachweis über einen biotinylierten anti-

Fab Antikörper gefolgt von PE-markiertem Streptavidin. Die Messungen im Durchflusszytometer zeigten ein deutlich geringeres Fluoreszenzsignal auf den Trypsin-behandelten Zellen im Vergleich zu den PBS-behandelten Zellen (Abb. 24). Besonders deutlich konnte dieser Unterschied bei den Fab-Fragmenten 3B und 3E beobachtet werden. Hier bestand ein höchst signifikanter Unterschied zwischen Trypsin-behandelten und PBS-behandelten Zellen. Bei 6E war das Fluoreszenzsignal auf den PBS-behandelten Zellen schon gering, weshalb hier der Unterschied zu den Trypsin-behandelten Zellen nicht so deutlich wurde. Dennoch war auch hier ein signifikanter Unterschied zu sehen. Die Ergebnisse lassen daher darauf schließen, dass es sich bei den Antigenen der drei Fab-Fragmente um trypsinsensitive Oberflächenproteine handelt und daher Oberflächenglykolipide ausgeschlossen werden können.

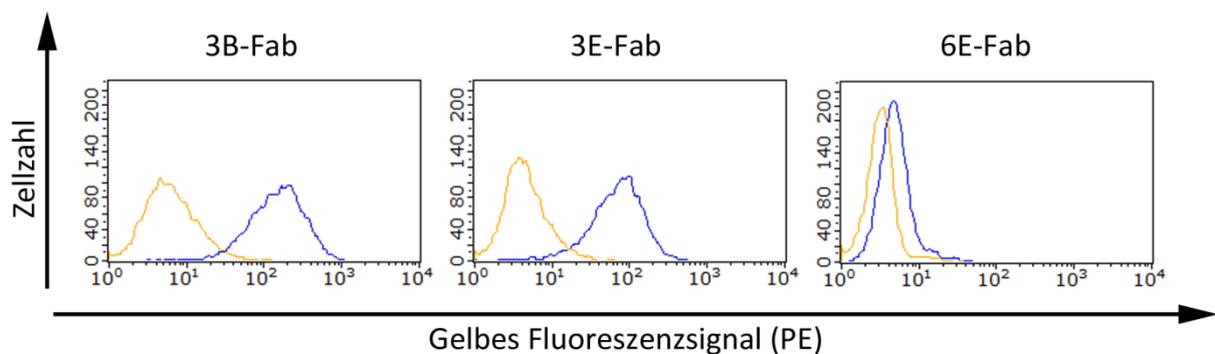


Abb. 24: Abnahme der Zell-Bindeaktivität der Fab-Fragmente nach Trypsinbehandlung

DMS 273 Zellen wurden mit Trypsin-EDTA behandelt, mit den drei Fab-Fragmenten 3B, 3E und 6E gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert (gelber Graph). Hierdurch sollte überprüft werden, ob es nach proteolytischem Verdau der Oberflächenproteine durch das Trypsin noch zu einer Bindung der Fab-Fragmente kommen konnte. Parallel dazu wurden DMS 273 Zellen mit PBS behandelt (blauer Graph) und anschließend die Bindung der Fab-Fragmente an die unterschiedlich behandelten Zellen miteinander verglichen. Der Bindungsnachweis erfolgte mittels biotinyliertem anti-Fab Antikörper und PE markiertem Streptavidin. Bei allen drei Fab-Fragmenten kam es durch die Trypsinbehandlung der Zellen zu einem signifikanten Rückgang des Fluoreszenzsignals, weshalb davon auszugehen ist, dass es sich bei den entsprechenden Antigenen um trypsinsensitive Oberflächenproteine handelt. Die Histogramme zeigen das gelbe Fluoreszenzsignal gegen die Zellzahl, wobei der gelbe Graph das Signal der Trypsin-behandelten Zellen und der blaue Graph die PBS-behandelten Zellen darstellt.

4.5.4 Immunhistochemie der Fab-Fragmente

Nachdem die Bindung der Fab-Fragmente auf vitalen Zellen im Durchflusszytometer gezeigt werden konnte, sollte anschließend die Bindeaktivität zu *ex vivo* Biopsiematerial in der Immunhistochemie (IHC) analysiert werden. Hierdurch wurde außerdem ein möglicher diagnostischer Einsatz der generierten Antikörper untersucht. Für die IHC wurden die 3 Fab-Fragmente 3B, 3E und 6E ausgewählt, da diese im Vergleich zu 6B und 1E einen Produktionsvorteil (schnelleres Wachstum und höhere Ausbeute) zeigten und von 3A als Fab-Fragment keine Bindeaktivität dokumentiert werden

konnte. Für optimale Färbeargebnisse musste zunächst für jedes Fab-Fragment die bestmögliche Strategie zur Epitopfreilegung ausgetestet werden. Hierbei kamen die gleichen Methoden zur Demaskierung von Antigenen zum Einsatz wie bei der Antikörperselektion (3.4.2). Die besten Färbeargebnisse wurden mit hitzeinduzierter Epitopfreilegung in Citrat Puffer erzielt, weshalb die Gewebeschnitte für alle weiteren Färbungen auf diese Weise vorbehandelt wurden. Nach Etablierung der optimalen Färbebedingungen wurden kommerziell erhältliche Tissue Microarrays (TMA) mit 35 verschiedenen SCLC Fällen unterschiedlicher Tumorstadien mit den Fab-Fragmenten gefärbt, wobei jeder Fall als Duplikat auf dem TMA vorlag. Außerdem wurden zur Analyse der Kreuzreaktivität TMA's mit 20 verschiedenen gesunden Organen gefärbt. Von jedem der 20 Organe befanden sich fünf Biopsate auf dem TMA. Die Bindung der Fab-Fragmente wurde durch DAB-Substrat visualisiert und zusätzlich die Zellkerne mit Hämatoxylin gegengefärbt. Alle 3 Fab-Fragmente zeigten eine starke Färbung auf den SCLC Fällen, unabhängig vom Tumorstadium. Im Vergleich dazu wurde keine oder nur eine minimale Kreuzreaktivität zu den 20 gesunden Organen beobachtet. Abb. 25 zeigt exemplarisch die Ergebnisse der Immunhistochemie von 6E.

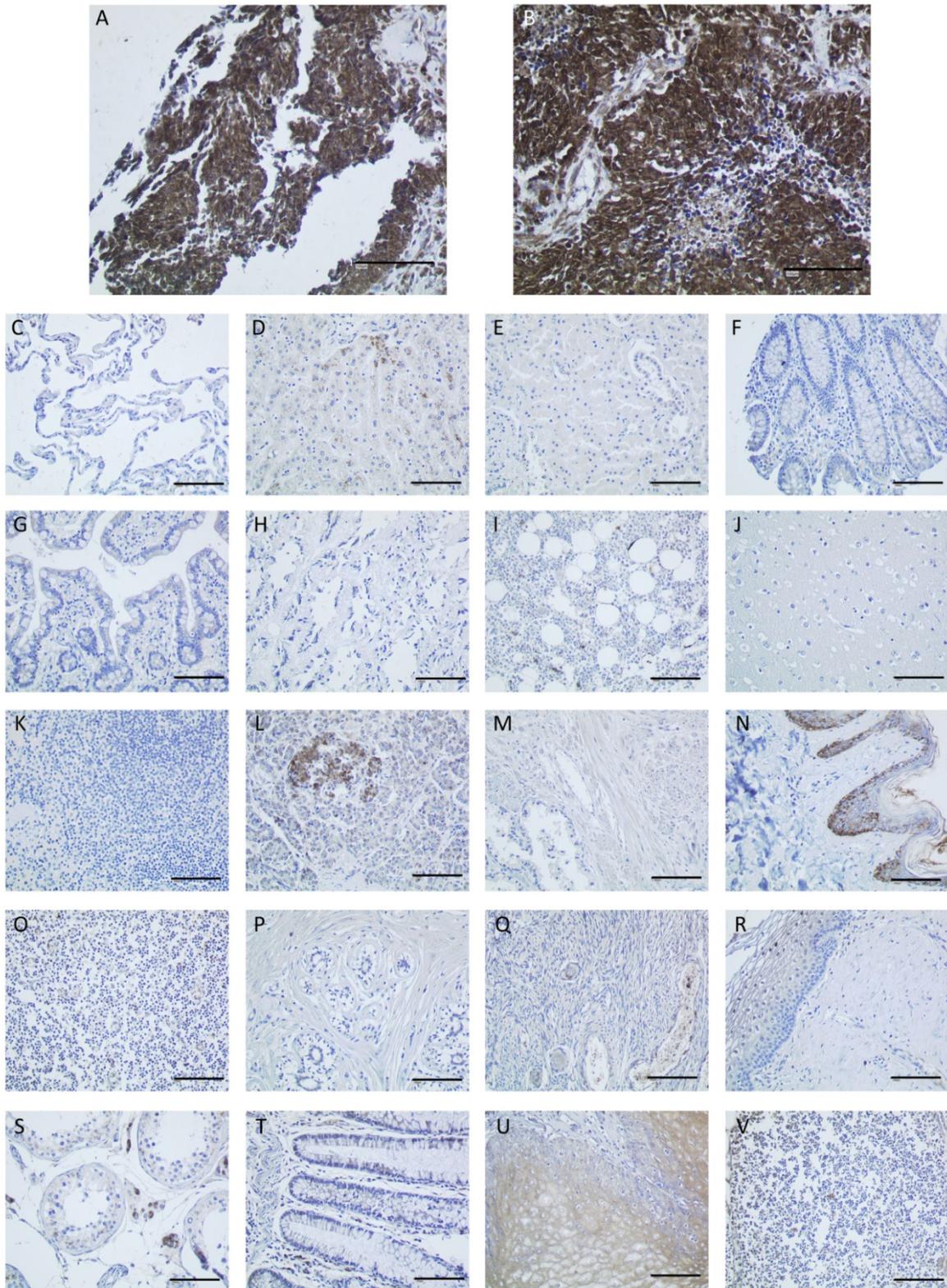


Abb. 25: Immunhistochemische Verifizierung der SCLC-spezifischen Fab-Bindeaktivität

Die Bindeaktivität der Fab-Fragmente wurde auf Tissue Micoarrays mit *ex vivo* Biopsiematerial von 35 verschiedenen SCLC Fällen und 20 verschiedene gesunde Organen immunhistochemisch untersucht. Die Bindung wurde mit DAB visualisiert, bevor die Zellkerne mit Hämatoxylin gegengefärbt wurden. Exemplarisch sind die Färbungen von 6E dargestellt. Die verschiedenen SCLC Fälle wurden stark angefärbt, wohingegen keine oder nur minimale Kreuzreaktivität zu gesunden Geweben dokumentiert wurde. **A:** SCLC **B:** SCLC **C:** Lunge **D:** Leber **E:** Niere **F:** Dickdarm **G:** Dünndarm **H:** Magen **I:** Knochen **J:** Gehirn **K:** Milz **L:** Pankreas **M:** Prostata **N:** Haut **O:** Lymphknoten **P:** Brust **Q:** Eierstock **R:** Gebärmutterhals **S:** Hoden **T:** Rektum **U:** Speiseröhre **V:** Thymus; — \cong 100 μ m

4.6 Herstellung und Analyse von rekombinanten Immuntoxinen

Nachdem die spezifische Bindung zu SCLC durch mehrere Methoden nachgewiesen und das Internalisierungsverhalten von drei der selektionierten Binder verifiziert werden konnte, wurde im Anschluss durch Generierung von rekombinanten Immuntoxinen ein möglicher therapeutischer Einsatz der selektionierten Binder evaluiert.

4.6.1 Herstellung der Immuntoxine

Für die Herstellung der Immuntoxine wurden die scFv Antikörperfragmente 3B, 3E und 6E an eine verkürzte Form des *Pseudomonas* Exotoxin A (ETA') genetisch gekoppelt. Bei dieser verkürzten Form des Toxins wurde die Bindedomäne entfernt und durch die scFv's ersetzt, so dass es nicht zu einer unspezifischen Bindung an Zellen kommen kann. Die Kopplung an die spezifischen Antikörper ermöglicht dann einen gerichteten Transport des Toxins zur Zielzelle. Die Internalisierung des scFv durch die Zielzelle führt zur Aufnahme des Toxins, wodurch es zur Inhibierung der Proteinbiosynthese kommt und somit Apoptose in der Zielzelle induziert wird. Für die Produktion der rekombinanten Immuntoxine wurden die scFv's in den prokaryotischen Expressionsvektor pMT-ETA' kloniert. Der korrekte Einbau wurde hierbei mittels Sequenzierung überprüft. Anschließend erfolgte die Produktion in Bakterien unter osmotischen und hypothermischen Stressbedingungen (3.3.1), gefolgt von einer Aufreinigung über das His₁₀ tag (3.3.2). Nach der Einengung und Umpufferung über Zentrifugalkonzentratoren (3.3.3) wurden die Immuntoxine mit einem 0,22 µm Sterilfilter für die späteren Toxizitätstests steril filtriert. Bei der Bestimmung des Proteingehalts durch Vergleich mit einem BSA Standard (3.3.7) lagen die Konzentrationen im Bereich von 100 - 220 µg/ml. Die Reinheit und Identität der rekombinanten Immuntoxine wurde durch eine Commassie Färbung (3.3.5) und einen Western Blot (3.3.6) überprüft. Hierbei konnten die drei Immuntoxine mit einer Proteingröße von 69 kDa eindeutig nachgewiesen werden. In der Coomassie-Färbung ist zu sehen, dass wie schon bei den aufgereinigten Fab-Fragmenten trotz Aufreinigung bakterielle Proteine in den eluierten Immuntoxin-Lösungen vorhanden waren (Abb. 26 A).

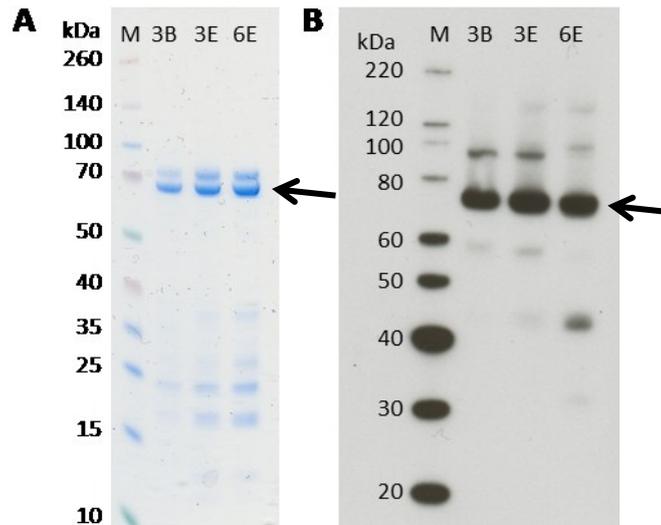


Abb. 26: Nachweis der ETA'-Konstrukte mittels Coomassie-Färbung und Western Blot

Die Herstellung und Aufreinigung der scFv-ETA' Konstrukte wurde mit Hilfe einer Coomassie Färbung (A) und eines Western Blots (B) überprüft. In der Coomassie Färbung sind trotz Aufreinigung noch bakterielle Proteine zu sehen. Im Western Blot konnten die ETA'-Konstrukte über einen anti-ETA' Antikörper spezifisch nachgewiesen werden. Durch einen Proteinstandardmarker konnte die korrekte Größe bei ca. 69 kDa ermittelt werden. Der Pfeil zeigt die entsprechenden Banden der Immuntoxine an.

kDa = Kilo Dalton; M = Proteinmarker

4.6.2 Bindungsanalyse der Immuntoxine

Nach erfolgreicher Herstellung der Immuntoxine wurde die Bindeaktivität zu DMS 273 Zellen und PBMC's im Durchflusszytometer untersucht (Abb. 27). Die Detektion erfolgte hierbei über die ETA' Domäne mit dem Maus anti-ETA' Antikörper TC-1 und einem gam-FITC Sekundärantikörper. Alle drei rekombinanten Immuntoxine zeigten eine deutliche Bindeaktivität zur Zielzelllinie, wobei die Bindung von 6E-ETA' etwa 30 % schwächer war, als von 3B- und 3E-ETA'. Keines der Konstrukte zeigte eine Bindung zu PBMC's.

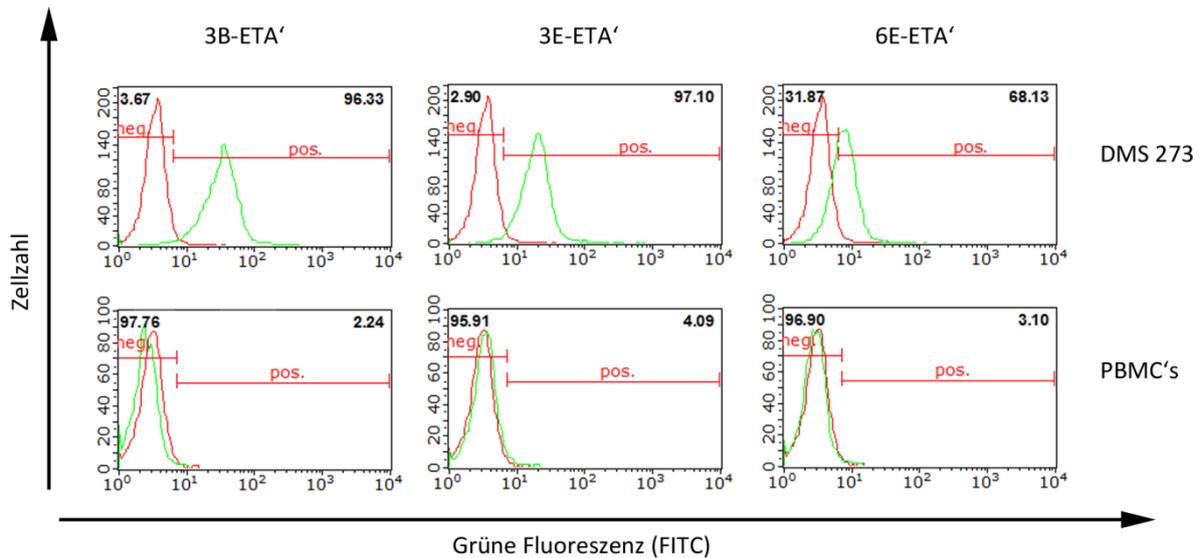


Abb. 27: SCLC-spezifische Bindung der rekombinanten Immuntoxine im Durchflusszytometer

Die Bindeaktivität der rekombinanten Immuntoxine 3B-ETA', 3E-ETA' und 6E-ETA' wurde im Durchflusszytometer auf DMS 273 und PBMC's untersucht. Die Bindung wurde hierbei durch den Maus anti-ETA Antikörper TC-1, gefolgt von einem gam-FITC Sekundärantikörper, nachgewiesen. Alle drei ETA'-Konstrukte zeigten eine deutliche Bindung zu der SCLC Zelllinie DMS 273, wobei die Bindung durch 6E-ETA' etwas schwächer war. Bei keinem der Konstrukte wurde eine Bindung zu der PBMC Kontrolle dokumentiert. Die Histogramme zeigen die grüne Fluoreszenzintensität gegen die Zellzahl. Der rote Graph steht hierbei für das Fluoreszenzsignal der Hintergrundkontrolle ohne ETA'-Konstrukt und der grüne Graph mit ETA'-Konstrukt.

4.6.3 Zytotoxizitätsanalysen der rekombinanten Immuntoxine

Nach erfolgreicher Produktion der drei Immuntoxine 3B-ETA', 3E-ETA' und 6E-ETA' und dem spezifischen Bindungsnachweis auf DMS 273 Zellen, wurde als nächstes das zytotoxische Potenzial der rekombinanten Immuntoxine analysiert. Hierfür wurden die proliferationshemmende Wirkung und die Apoptoseinduktion in SCLC-Zellen untersucht.

Zunächst wurde der Einfluss auf die Zellproliferation und metabolische Aktivität mit Hilfe eines XTT-Assays (3.7.2) analysiert. Das Tetrazoliumsalz XTT wird von stoffwechselaktiven Zellen zu wasserlöslichem Formazan reduziert. Hierbei ist die Menge an gebildetem Formazan ein Maß für die Zellviabilität [127]. Die drei SCLC Zelllinien DMS 273, NCI-H69 und NCI-H82 wurden mit absteigenden Konzentrationen (95; 47,5; 23,75; 11,88; 5,94 und 2,97 nM) der Immuntoxine inkubiert. Parallel dazu wurden Zellen als Kontrollen mit PBS (Negativkontrolle, \cong 100 % Viabilität) und Zeocin (Positivkontrolle, \cong 0 % Viabilität) behandelt. Das irrelevante Immuntoxin H22-ETA' (anti-CD64) wurde eingesetzt, um den Einfluss des ETA' Toxins ohne zielgerichteten Transport auf die Zellen zu überprüfen. Außerdem erfolgte eine Inkubation der Immuntoxine auf den Negativzelllinien NALM-6 und NK92-C1. 72 h nach Behandlung der Zellen erfolgte die Zugabe des XTT, bevor 4 h später die

Umwandlung zu Formazan mit Hilfe eines ELISA-Readers gemessen wurde. Die Immuntoxine 3B-ETA' und 3E-ETA' zeigten eine dosisabhängige Wachstumsinhibierung auf allen drei SCLC Zelllinien, wohingegen von 6E-ETA' nur in hoher Konzentration (95 nM) eine schwache proliferationshemmende Wirkung von 35 % auf DMS 273 und 20 % auf NCI-H69 dokumentiert wurde (Abb. 28). Die Berechnung der mittleren inhibitorischen Dosis (IC_{50}) erfolgte über eine nicht-lineare Regression. Hierbei lag der gemittelte IC_{50} -Wert aller drei SCLC Zelllinien von 3B-ETA' bei $22,94 \pm 4,63$ nM und von 3E-ETA' bei $21,78 \pm 1,70$ nM (Tabelle 13). Keiner der drei Immuntoxine beeinflusste die Proliferation der Negativzelllinien und auch das irrelevante Immuntoxin H22-ETA' nahm keinen Einfluss auf die Viabilität der DMS 273 Zellen. Dies zeigt, dass die proliferationshemmende Wirkung der Immuntoxine von der spezifischen Bindung der Antikörperkomponente abhängig ist und ETA' alleine keinen Einfluss auf die Zellen nimmt.

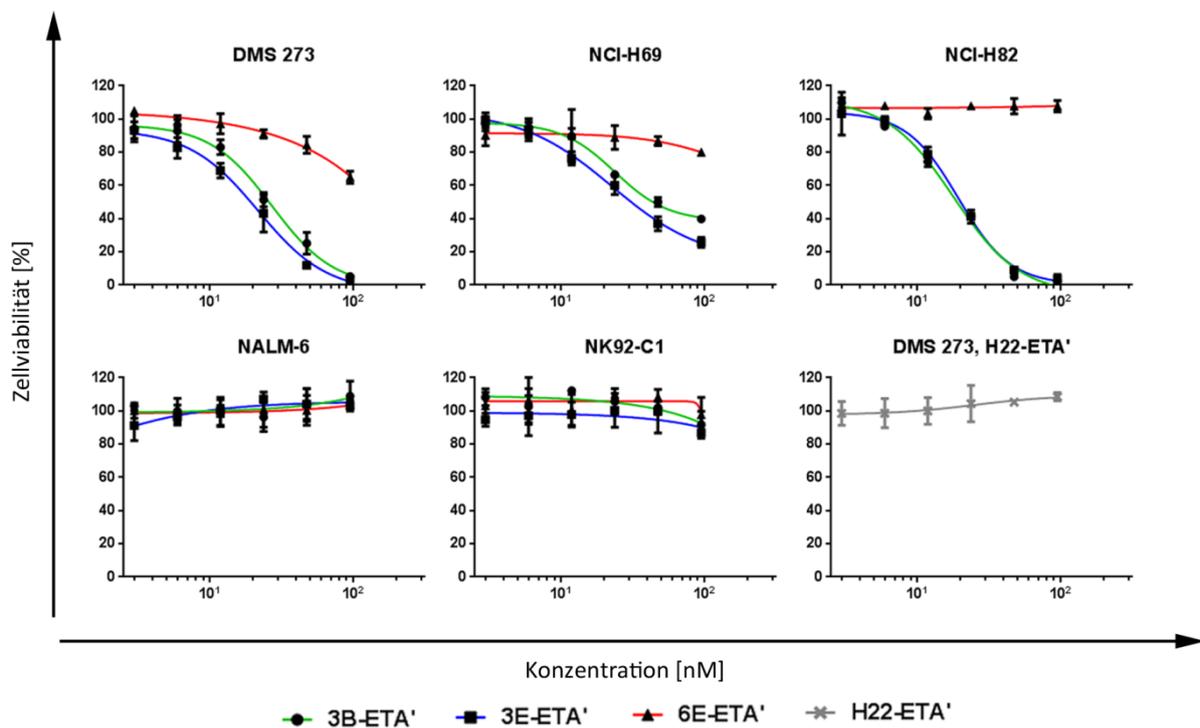


Abb. 28: Proliferationshemmende Wirkung der Immuntoxine

Die proliferationshemmende Wirkung der drei Immuntoxine 3B-ETA', 3E-ETA' und 6E-ETA' wurde auf den SCLC Zelllinien DMS 273, NCI-H69 und NCI-H82 und den Negativzelllinien NALM-6 und NK92-C1 mit Hilfe eines XTT-Assays untersucht. Hierbei wurden die Zellen mit absteigenden Konzentrationen (95; 47,5; 23,75; 11,88; 5,94 und 2,97 nM) der Immuntoxine für 72 h inkubiert. Zusätzlich wurden weitere Zellen aller Linien mit PBS (\cong 100 % Viabilität), Zeocin (\cong 0 % Viabilität) und dem irrelevanten Immuntoxin H22-ETA' (anti-CD64) behandelt. Bei 3B-ETA' und 3E-ETA' wurde eine dosisabhängige proliferationshemmende Wirkung auf allen drei SCLC Zelllinien beobachtet, wohingegen 6E-ETA' nur auf DMS 273 und NCI-H69 in hohen Konzentrationen einen schwachen Effekt zeigte. Alle drei Immuntoxine zeigten keinen Effekt auf den Negativkontrollzelllinien. Außerdem zeigte das irrelevante Immuntoxin H22-ETA' ebenfalls keinen Einfluss auf die Proliferation von DMS 273. Dargestellt ist eine Dosis-Wirkungskurve von Triplikaten jeweils mit Standardabweichung.

Tabelle 13: Mittlere inhibitorische Dosis (IC₅₀) der Immuntoxine

IC ₅₀ -Werte			
	3B-ETA'	3E-ETA'	6E-ETA'
DMS 273	27,11 nM	21,75 nM	-
NCI-H69	23,76 nM	22,70 nM	141,50 nM
NCI-H82	17,95 nM	19,40 nM	-
Mittelwert	22,94 ± 4,63 nM	21,28 ± 1,70 nM	-

Nach Verifizierung der proliferationshemmenden Wirkung wurde überprüft, ob es durch die Immuntoxine zur Induktion von Apoptose in den Zielzellen kommt. Die Bestimmung der apoptotischen und nekrotischen Zellen erfolgte durch eine Alexa 488-Annexin V/7AAD Doppelfärbung (3.7.3). Während der frühen Phase der Apoptose kommt es zum Verlust der Membranasymmetrie, wodurch es zur Translokation des normalerweise zytoplasmatischen Phosphatidylserin zur extrazellulären Seite kommt. Annexin V bindet mit hoher Affinität an Phosphatidylserin, so dass es auf der extrazellulären Seite nachgewiesen werden kann. Zur Differenzierung von apoptotischen und nekrotischen Zellen wurden die Zellen parallel mit dem DNA interkalierenden Vitalfarbstoff 7AAD angefärbt. 7AAD kann die Membran von lebenden Zellen nicht durchdringen und färbt daher nur spät-apoptotische oder nekrotische Zellen an.

Die SCLC Zelllinie DMS 273 wurden für 72 h mit 1 µg (\cong 95 nM) der Immuntoxine inkubiert. Gleichzeitig wurden DMS 273 Zellen auch mit PBS (Negativkontrolle), Zeocin (Positivkontrolle) und dem irrelevanten Immuntoxin H22-ETA' behandelt (Abb. 29). Hierbei induzierte 3B-ETA' in $27,2 \pm 1,4$ % der Zellen Apoptose, während $28,5 \pm 1,9$ % nekrotisch waren. Bei der Behandlung mit 3E-ETA' wurde in $28,7 \pm 1,1$ % der Zellen Apoptose und in $26,3 \pm 0,6$ % der Zellen Nekrose dokumentiert. Diese Werte waren höchst signifikant im Vergleich zu den PBS behandelten Zellen mit $8,9 \pm 1,2$ % apoptotischen und $11,8 \pm 1,6$ % nekrotischen Zellen. Die Inkubation mit 6E-ETA' zeigte keinen zytotoxischen Effekt mit $8,7 \pm 1,8$ % apoptotischen und $13,5 \pm 1,5$ % nekrotischen Zellen. Ebenfalls keine Wirkung auf die Zellen zeigte die Behandlung mit dem irrelevanten Immuntoxin H22-ETA'. Die Messungen der Annexin V/7AAD Färbung entsprechen demnach den Ergebnissen der XTT-Assays zur Bestimmung der Zellviabilität.

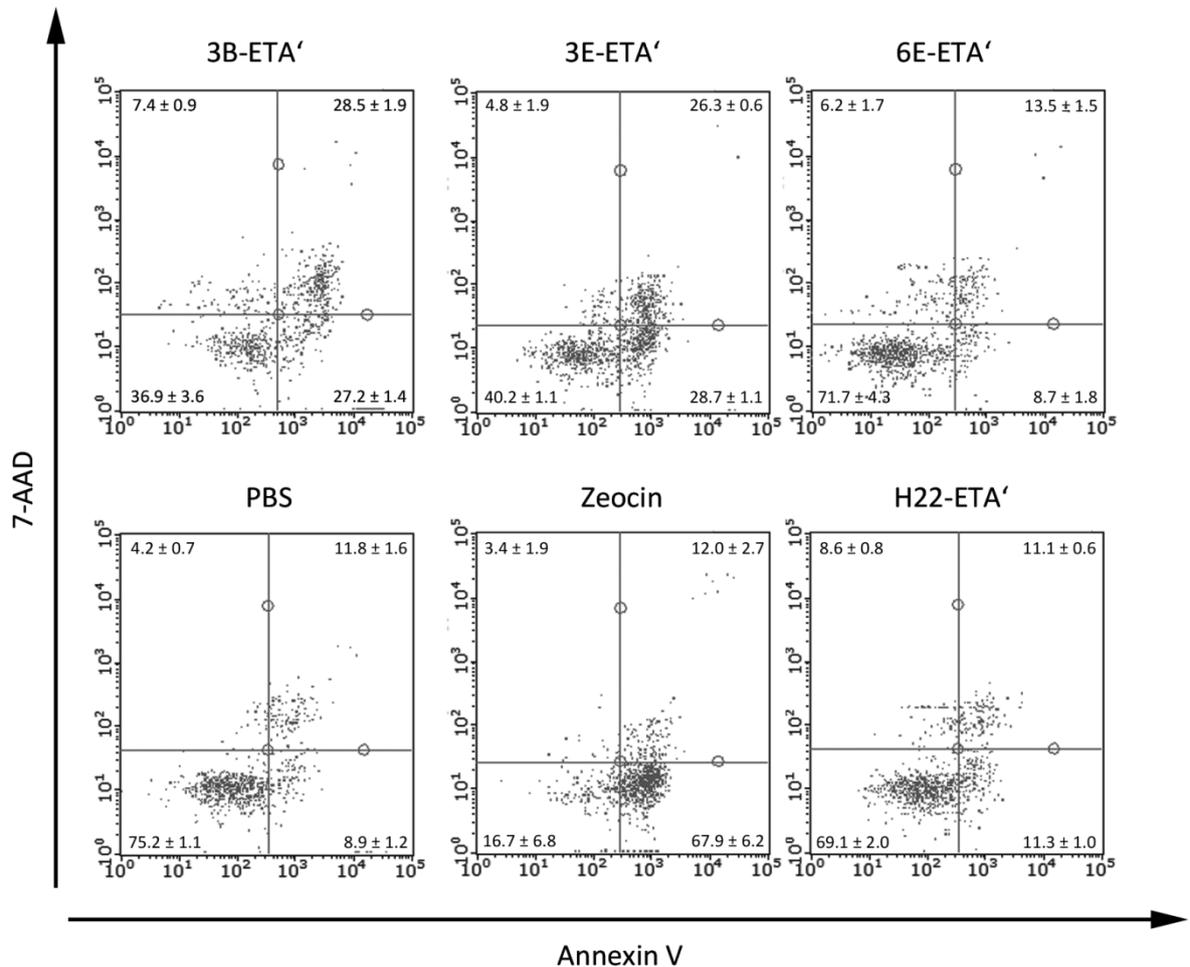


Abb. 29: Zytotoxischer Effekt der rekombinanten Immunttoxine

Der zytotoxische Effekt der Immunttoxine 3B-ETA', 3E-ETA' und 6E-ETA' auf DMS 273 wurde mit Hilfe einer Annexin V/7AAD Doppelfärbung und anschließender Messung im Durchflusszytometer bestimmt. Hierfür wurden die Zellen für 72 h mit 1 µg der Immunttoxine inkubiert. Parallel dazu wurden die Zellen mit PBS (Negativkontrolle), Zeocin (Positivkontrolle) und dem irrelevanten Immuntoxin H22-ETA' behandelt. Der untere rechte Quadrant des Punktdiagramms zeigt den Anteil der früh-apoptotischen Zellen und der obere rechte Quadrant den Anteil der spät-apoptotischen bzw. nekrotischen Zellen an. Hierbei wurde ein zytotoxischer Effekt der Immunttoxine 3B-ETA' und 3E-ETA' beobachtet, der im Vergleich zu der PBS Kontrolle höchst signifikant war. 6E-ETA' und das irrelevante Immuntoxin H22-ETA' zeigten keinen Effekt auf die DMS 273 Zellen im Vergleich zur PBS Kontrolle.

4.7 Übersicht der Antikörper-Charakterisierung

Eine genaue Charakterisierung der selektierten Antikörperfragmente erfolgte an neun einzigartigen Klonen. Im Rahmen der Bindungsanalysen wurden diese teilweise in die verschiedenen Antikörperformate scFv-Fc Fusionsprotein, Fab-Fragment und rekombinantes Immuntoxin umgewandelt. Die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

Tabelle 14: Übersicht der Charakterisierung der selektionierten Antikörper

Klon	scFv Phage	scFv-Fc		Fab-Fragment		Internalisierung		Viabilität
	ELISA	ELISA	FACS	FACS	IHC	FACS	Konfokal	IC ₅₀ ± SD in nM
3A	+++	-	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3B	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	22.94 ± 4.63
6B	+++	+++	+++	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2C	++	+	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
11D	++	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1E	+++	+++	+++	++	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3E	+	+++	+++	+++	+++	++	+++	21.28 ± 1.70
6E	+	++	+++	+	+++	+	+	-
3G	+++	+	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Spalte 2 - 6 zeigt die Bindungsanalysen der selektionierten Antikörperfragmente in verschiedenen Antikörperformaten, Spalte 7 und 8 das Internalisierungsverhalten und Spalte 9 die proliferationshemmende Wirkung. Die selektionierten Binder wurden hierbei in schwach (+), moderat (++) und stark (+++) eingeteilt, basierend auf den ELISA Absorptionswerten (+ 10 - 100x, ++ 100 - 200x, +++ >200x Hintergrundsignal), der prozentualen Zellverschiebung in der Durchflusszytometrie (FACS) (+ 20 - 50 %, ++ 50 - 70 %, +++ > 70 %), der Färbeintensität in der Immunhistochemie (IHC) (+ schwach, ++ moderat, +++ stark) und der Zeit für mindestens 50 % Internalisierung (+ 60 - 240 min, ++ 15 - 60 min, +++ < 15 min). Die Bestimmung der proliferationshemmenden Wirkung (Viabilität) erfolgte als rekombinantes Immunotoxin.

n.d. = nicht bestimmt; IC₅₀ = mittlere inhibitorische Dosis; SD = Standardabweichung

Somit konnte gezeigt werden, dass mittels der hier etablierten *On Slide* Selektion auf FFPE-Routinematerial hoch spezifische Antikörper generiert werden können, die sich für einen Einsatz in der Diagnostik und Therapie von malignen Erkrankungen eignen.

5 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine neue, Phage Display-basierte Antikörperselektionsstrategie direkt auf Formalin-fixiertem und in Paraffin-eingebettetem Patientengewebe etabliert. Die selektionierten Antikörper wurden auf ihre spezifische Bindeaktivität untersucht und deren diagnostisches und therapeutisches Potenzial evaluiert. Im Folgenden werden die Ergebnisse der *On Slide* Selektion kritisch diskutiert.

5.1 FFPE Gewebe als Ausgangsmaterial für die Antikörperselektion

Formalin-Fixierung und Paraffin-Einbettung ist ein weltweit validiertes Standardverfahren von Pathologien und anderen Routinelaboren zur Konservierung von Biopsaten, weshalb theoretisch Biopsiematerial von jeder Tumorentität als Ausgangsmaterial für Antikörperselektionen vorhanden ist [63]. FFPE Gewebe wird bei Raumtemperatur gelagert und ist über Jahre stabil [143]. Dies stellt einen großen Vorteil gegenüber Gefriermaterial und biotechnologisch hergestellten, rekombinanten Proteinen dar, deren Lagerung vergleichsweise aufwendig ist. Da die Etablierung auf Routinematerial erfolgte, welches den Patienten für die Diagnose entnommen wurde, entstand keine zusätzliche Belastung für die Patienten. Das entnommene Gewebe wird direkt nach der Resektion konserviert, so dass der Tumor in seiner nativen Konformation erhalten bleibt und weitestgehend seine klinischen Charakteristika behält [62]. Bei Zellkulturen konnte gezeigt werden, dass sich die Expression von Oberflächenepitopen nach einigen Passagen im Vergleich zum Ursprungsgewebe verändert [144]. Hierdurch besteht die Gefahr, Antikörper gegen Epitope zu selektionieren, die auf dem Ursprungsgewebe gar nicht oder in aberranter Form exprimiert werden. Des Weiteren beeinflusst das Tumorenvironment die Antigenexpression, weshalb es in kultivierten Zellen zu genetischen und epigenetischen Veränderungen im Vergleich zum Ursprungsgewebe und dadurch zu veränderter Antigenexpression kommen kann [57]. Somit handelt es sich bei FFPE Gewebe um ein geeigneteres Ausgangsmaterial für die Selektion tumorspezifischer Antikörper gegen klinisch relevante Epitope als kultivierte Zellen oder rekombinante Proteine [57, 61].

Allerdings kann es bei FFPE Gewebe zu Quervernetzungen und teilweise zur Denaturierung von Proteinen kommen, weshalb Epitope für Antikörper maskiert und damit unzugänglich sein können [145]. Diese Quervernetzungen entstehen zunächst durch die Reaktion des Fixierungsagens Formaldehyd mit den Stickstoffatomen der funktionellen Gruppen (z.B. primäre Amine, Purine) und der Peptidbindungen innerhalb der Proteine, wodurch es zur Bildung von Hydroxymethylgruppen kommt [146]. Anschließend kommt es zur weiteren Quervernetzung zwischen den

Hydroxymethylgruppen. Bei der Verwendung von FFPE Gewebe als Ausgangsmaterial ist daher die Freilegung der Antigene von entscheidender Bedeutung, um so die Zugänglichkeit der Epitope für die Antikörper zu ermöglichen [58]. 1975/76 konnten Huang *et al.* zeigen, dass durch Behandlung von FFPE Material mit proteolytischen Enzymen die Immunoreaktivität der Antigene wieder hergestellt werden konnte und somit ein verbesserter immunhistochemischer Nachweis möglich war [147, 148]. Der enzymatische Verdau zur Vorbehandlung von Schnitten wurde später unter proteolytisch-induzierter Epitopfreilegung („*proteolytic induced epitope retrieval*“ PIER) bekannt. Anfang der 90iger Jahre wurde von Shi *et al.* eine hitzeinduzierte Epitopfreilegung („*heat induced epitope retrieval*“, HIER) entwickelt, wodurch die Analyse von FFPE Material weiter verbessert wurde [149, 150]. Das Erhitzen löst die quervernetzten Methylenbrücken zwischen den Antigenen, erhöht die Gewebeporosität und entfernt Paraffinreste, wodurch es zur Demaskierung der Epitope kommt [151]. Die Effektivität wird hierbei vom pH-Wert und der Ionenstärke des verwendeten Puffers beeinflusst [152, 153]. Sowohl PIER, als auch HIER sind heutzutage weitgehend anerkannte Methoden zur Antigendemaskierung bei FFPE Gewebe. Da die möglichen Antigene bei der *On Slide* Selektion unbekannt sind, kann die optimale Antigendemaskierungsmethode nicht vorhergesagt werden. Aus diesem Grund wurden für die Depletion und Selektion verschiedene Demaskierungsmethoden angewandt, um so den Erfolg der Selektion zu erhöhen. Es wurden daher in jeder Runde nach der Entparaffinierung ein Schnitt durch HIER in Citratpuffer mit pH 6,0, ein Schnitt durch HIER in EDTA-Puffer mit pH 9,0 und ein Schnitt durch PIER mit Proteinase K vorbehandelt. Außerdem wurde in jeder Runde auch ein Schnitt nur entparaffiniert und keiner weiteren Behandlung unterzogen, da nicht alle Antikörper und jedes Antigen eine Demaskierung benötigen [151]. Die Anreicherung von scFv-präsentierenden Phagen mit Bindeaktivität zu NCI-H82 Membranfragmenten innerhalb der drei Selektionsrunden (4.2) und die hohe Anzahl positiver Binder im monoklonalen Phagen-ELISA (207 von 440 getesteten, 4.3) bestätigte, dass die Zugänglichkeit der Antigene durch mindestens eine der Vorbehandlungen ermöglicht wurde. Da die Phagen der unterschiedlich vorbehandelten Schnitte nach Elution gemischt wurden, erfolgte keine Analyse, bei welcher Vorbehandlung die meisten Phagen von den Schnitten eluiert wurden.

Des Weiteren spielt auch die Antigenkonzentration für eine erfolgreiche Selektion eine wichtige Rolle. Die Konzentration der komplexen Antigenstrukturen auf den Gewebeschnitten kann im Gegensatz zu rekombinanten Proteinen als Ausgangsmaterial nicht eingestellt werden und lässt sich bei unbekanntem Antigen auch nicht exakt definieren. Entscheidend für die Selektion auf Gewebe ist daher neben der Konzentration auch die Immunogenität der Antigene. Generell sind komplexe Antigenstrukturen immunogener als einfache [1], so dass es bei hoher Immunogenität auch zu einer Bindung der Antikörper an geringe Mengen des Antigens kommen kann.

Ein weiteres Problem bei der Verwendung von Biopsaten als Ausgangsmaterial für Antikörperselektionen ist die Heterogenität des malignen Gewebes [61]. Es besteht aus einem Gemisch von verschiedenen Zellen wie Tumorzellen, Stromazellen, Endothelzellen und inflammatorischen Zellen. Hierdurch kann nicht sichergestellt werden, dass die Antikörperpräsentierenden Phagen an Tumorzellen binden. Aus diesem Grund wurde Patientenmaterial gewählt, das nahezu ausschließlich aus malignem Gewebe bestand. Die Gewebe wurden hierfür vor der Selektion von einem erfahrenen Pathologen begutachtet.

Dadurch, dass die Antikörper auf FFPE Gewebe selektioniert wurden, sind diese per se paraffingängig und eignen sich somit für eine immunhistochemische *ex vivo* Diagnose. Die Immunhistochemische Färbung der Tissue Microarrays bestätigt die Paraffingängigkeit der selektionierten Antikörper nochmals. Bei der Standardselektion und auch bei immunisierten Tieren müssen die generierten Antikörper nachträglich auf ihre Paraffingängigkeit überprüft werden. Hierbei bindet nur ein geringer Teil der Antikörper auch auf FFPE Gewebe [63].

In der Literatur sind bereits *ex vivo* Antikörperselektionen beschrieben [57-64], allerdings im Vergleich zu Selektionen auf definierten Antigenen oder Zellen nur sehr wenige. Bei diesen konnten erfolgreich spezifische Antikörper selektioniert werden. Jedoch wurden im Vergleich zu der vorliegenden Arbeit gefrorene Biopsate verwendet [57-59, 61, 62] und wenn FFPE Gewebe verwendet wurde, handelte es sich nicht um Patientenbiopsate, sondern um Formalin-fixierte und in Paraffin-eingebettete Zelllinien [60, 62]. Außerdem wurde in den meisten Fällen für die Selektion ein Laser Capture Mikroskop (LCM) eingesetzt, um mittels Microdissektion die Tumorzellen vom restlichen Gewebe trennen zu können. Hierdurch war der Selektionsprozess deutlich komplizierter, unter anderem weil die Phagen den Dissektionsprozess schlecht überstanden hatten. Jarutat *et al.* haben als einzige Arbeitsgruppe ebenfalls FFPE Patientenmaterial für die Selektion verwendet [63], allerdings erfolgte die Selektion hier nicht auf immobilisierten, sondern auf in Lösung schwimmenden Schnitten, weshalb das Wechseln der Lösungen z.B. beim Waschen der Schnitte wesentlich aufwendiger war. Des Weiteren wurden die Antigene nur durch hitzeinduzierte Epitopfreilegung demaskiert. Daher handelt es sich bei der in dieser Arbeit beschriebenen *On Slide* Selektion um die erste Phage Display basierte Antikörperselektion direkt auf Patienten FFPE Routinematerial, welches auf Glasobjektträgern immobilisiert und deren komplexe Antigenstrukturen auf verschiedene Arten demaskiert wurden. Die hier etablierte Methode stellt daher eine wesentliche Weiterentwicklung und Vereinfachung der bisherigen Selektionen auf Gewebe dar.

5.2 Die *On Slide* Selektion

Für die durchgeführten Selektionen wurden die humanen scFv Antikörperbibliotheken Tomlinson I und J verwendet. Bei den Bibliotheken handelt es sich um semisynthetische Bibliotheken mit einer Größe von $1,47 \times 10^8$ verschiedenen Antikörperfragmenten bei I und $1,37 \times 10^8$ bei J, wobei die Diversität durch Inkorporation von DVT bzw. NNK Zufallsnukleotiden in die CDR2 und CDR3 der leichten und schweren Kette entstand [46]. Diese Bibliotheken wurden von zahlreichen Arbeitsgruppen erfolgreich für die Selektion spezifischer Antikörperfragmente eingesetzt [60, 122, 154-156].

Vor Beginn der Selektionen wurden beide Bibliotheken auf Vorhandensein eines scFv DNA-Fragments überprüft, da es bei mehrfacher Amplifikation auf Grund eines Wachstumsvorteils zu einer Anreicherung von Insert-losen Phagemiden kommen kann. Hierdurch nehmen die Diversität und damit die Wahrscheinlichkeit, spezifische Antikörperfragmente zu selektionieren, ab. Für die Überprüfung wurden je Bibliothek 15 Klone zufällig ausgewählt und mittels Kolonie-PCR überprüft. Hierbei enthielten alle Klone ein scFv-Insert (Abb. 12), so dass von einer ausreichenden Diversität der Bibliotheken ausgegangen werden konnte.

Für die ersten Selektionsrunden wurden bei der Produktion der scFv-präsentierenden Phagen Hyperphagen verwendet, wodurch eine polyvalente Darstellung der Antikörper gewährleistet wurde. Hierdurch beruhte die Bindung der Antikörper nicht nur auf der intrinsischen Affinität, sondern zusätzlich auch auf der multivalenten Avidität. Da davon auszugehen war, dass der Anteil an SCLC-spezifischen Antikörpern innerhalb der Ausgangsbibliotheken gering war [31], sollten diese wenigen Binder zunächst durch die polyvalente Darstellung angereichert werden. In den darauffolgenden Runden wurden dann aber Helferphagen verwendet, um so durch die monovalente Darstellung bindungsaffinere Antikörper zu selektionieren [50]. Des Weiteren wurde nach jeder Runde die Waschstringenz erhöht, um so ebenfalls den Selektionsdruck auf bindungsaffinere Antikörper zu erhöhen. Die Waschstringenz konnte jedoch nicht beliebig erhöht werden, da sich die Gewebeschnitte bei zu stringenter Waschung von den Objektträgern ablösten. Außerdem konnte die Antigenkonzentration nicht von Runde zu Runde verringert werden, was ebenfalls den Selektionsdruck auf affinere Binder erhöht, weil das Antigen bei der Selektion unbekannt war.

Da es sich bei den meisten Oberflächenantigenen um weit verbreitete Antigene handelt, die auf vielen verschiedenen Zellen, unabhängig ob normal oder maligne, vorkommen, besteht bei der Verwendung von Gewebeschnitten eine hohe Wahrscheinlichkeit Antikörper gegen gängige Antigene zu generieren [60]. Die Isolation von krankheitsrelevanten Antikörpern hängt daher stark von der Subtraktion irrelevanter Antikörper ab. Aus diesem Grund wurde eine Depletion auf gesundem

Lungengewebe durchgeführt. Jarutat *et al.* verzichteten in der ersten Selektionsrunde auf eine Depletion, diskutierten jedoch darüber, dass der Verzicht der Depletion zu einer Anreicherung von irrelevanten Antikörpern geführt haben könnte [63]. Daher wurde in dieser Arbeit vor jeder Selektionsrunde eine Depletion durchgeführt. Dennoch zeigt die teilweise beobachtete Kreuzreaktivität einiger Binder im monoklonalen Phagen-ELISA, dass die Spezifität der selektionierten Antikörperfragmente bei Verwendung von Gewebeschnitten problematisch sein kann. Eventuell ließe sich der Anteil an unspezifischen Antikörpern durch eine weitere Depletion nach der letzten Selektionsrunde reduzieren und so der Anteil an spezifischen Bindern noch weiter erhöhen. Die beobachtete Kreuzreaktivität deutet jedoch nicht zwangsläufig auf eine mangelnde Spezifität der selektionierten Binder hin, da bereits berichtet wurde, dass 90 % aller monoklonalen Antikörper trotz hoher Antigenspezifität andere Antigene erkennen können [157].

Die erhaltenen Output-Titer lagen bei allen Patienten in der ersten Runde zwischen 10^5 und 10^7 und in der 2. und 3. Runde zwischen 10^6 und 10^9 . Die Titer entsprachen demnach bereits beschriebenen Selektionen mit den Tomlinson Bibliotheken [46]. Die Anreicherungsfaktoren unterschieden sich zwischen den Geweben der einzelnen Patienten teils deutlich (s. Tabelle 11). Während es bei Patient 1 laut berechnetem Anreicherungsfaktor eher zu einer Abreicherung kam, stieg der Faktor bei den drei anderen Patienten jede Runde an. Besonders deutlich wurde dies bei Patient 4 mit einem Anreicherungsfaktor der 3. Runde von 431. Trotz der unterschiedlichen Anreicherungsfaktoren konnte durch die polyklonalen Analysen bei allen vier Patienten eine deutliche Anreicherung SCLC-spezifischer Antikörperfragmente dokumentiert werden (Abb. 13 & Abb. 14). Hierdurch konnte gezeigt werden, dass alle Selektionen erfolgreich verliefen. Dies wurde bei der späteren monoklonalen Analyse der verschiedenen Selektionen bestätigt, da von allen 4 Patientengeweben SCLC-spezifische Binder isoliert werden konnten. Hierbei zeigten 47,1 % der getesteten Klone Bindeaktivität zu SCLC Membranfragmenten. Ein ähnlicher Wert (50 %) wurde auch von anderen Arbeitsgruppen unter Verwendung von Hyperphagen innerhalb der Selektionen beschrieben [52].

Auf Gewebeschnitten befinden sich immer verschiedene Ebenen von Zellen und daher sowohl Zelloberflächen als auch intrazelluläre Bereiche. Ein Teil der selektionierten Binder könnte deshalb gegen intrazelluläre Antigene gerichtet sein. Diese Binder zeigten im monoklonalen ELISA auf den Membranfragmenten keine Bindeaktivität, weshalb der Anteil an positiven Bindern nach der Selektion noch deutlich höher gewesen sein könnte. Da für eine therapeutische Anwendung der Antikörper jedoch nur oberflächenspezifische Antikörper in Frage kommen, sollten innerhalb der monoklonalen Analyse auch nur Oberflächenbinder berücksichtigt werden.

Beim Vergleich der untersuchten Klone von Bibliothek I und J nach Selektion auf Patient 1 zeigte sich, dass innerhalb der Bibliothek I nur schwache Binder selektioniert wurden. Auch kooperierende

Arbeitsgruppen des Fraunhofer Instituts IME in Aachen konnten aus der Bibliothek I keine positiven Binder isolieren (mündliche Mitteilung Dr. M.K. Tur, [122]). Bei anderen Arbeitsgruppen war der Anteil an positiven Bindern aus Bibliothek I ebenfalls geringer als aus J [157, 158]. So stammten bei Eteshola *et al.* 4 von 14 Klonen aus Bibliothek I (28,6 %) und bei Wu *et al.* nur 2 von 10 (20 %). Daher wurde für die weiteren Selektionen der anderen drei Patienten nur noch die Bibliothek J verwendet.

Bei der Sequenzierung der 12 genauer charakterisierten Klone wurde bei 11 Klonen in der schweren Kette ein amber Stopcodon dokumentiert. Theoretisch sollte die Bibliothek durch die Diversifizierung mittels NNK Zufallsnukleotiden nur in 3 % der Klone ein Stopcodon enthalten. Dieser erhöhte Anteil an Stopcodons bei Klonen aus der Tomlinson Bibliothek J ist in der Literatur jedoch mehrfach beschrieben, wobei Stopcodons in 50 - 100 % der Klone auftraten [157-162]. Hier scheint ein Selektions- oder Wachstumsvorteil der Stopcodon-beihaltenden Phagen zu bestehen, weshalb es zur Anreicherung kommt [163]. Während der Selektionsrunden wurden die scFv-präsentierenden Phagenpartikel in dem suppressor-Stamm *E.coli* TG1 exprimiert, welcher die Translation bei einem Stopcodon nicht abbricht, sondern stattdessen die Aminosäure Glutamin einbaut. Für die Expression löslicher scFv's in non-supressor Stämmen und in Eukaryoten mussten die Stopcodons jedoch entfernt werden. Durch die ortsgerichtete Mutagenese (3.4.6) wurden die TAG-Codons in CAG umgewandelt, so dass auch in non-suppressor-Stämmen und Eukaryoten bei der Translation ein Glutamin eingebaut wurde. Diese Mutagenese war bei 9 der 11 Klone erfolgreich. Die Klone 3C und 8D ließen sich auch nach wiederholter Mutagenese nicht ummutieren. Außerdem konnte der Klon 4E, welcher kein Stopcodon enthielt, trotz mehrmaligem Versuch nicht in den Expressionsvektor pMS2 umklontiert werden. Diese drei Klone zeigten jedoch im monoklonalen Phagen-ELISA die geringsten Absorptionswerte (Abb. 15), weshalb die darauffolgenden Bindungsanalysen mit den 9 verbliebenen scFv Fragmenten fortgesetzt wurden.

5.3 Umwandlung der selektionierten Binder in verschiedene Antikörperformate

Auf Grund des modularen Aufbaus von Antikörpern können diese durch rekombinante Technologien in unterschiedlichen Formaten dargestellt werden. Die Charakterisierung der selektionierten Binder als lösliche Antikörper erfolgte als Fc-Fusionsproteine und als Fab-Fragmente.

Für die Produktion als Fc-Fusionsproteine wurden die DNA-Fragmente der scFv's in den eukaryotischen Expressionsvektor pMS2 kloniert. Die scFv's wurden dabei im Leseraster oberhalb eines murinen IgG2a Fc-Teils gebracht, wodurch die scFv-Fc Fusionsproteine exprimiert werden konnten. Der Fc-Teil ermöglicht hierbei die Detektion der Fusionsproteine mittels kommerziell

erhältlicher anti-Maus Sekundärantikörper. Zusätzlich können auf Grund der Hinge-Region Fc Fusionsprotein-Dimere entstehen, wodurch eine bivalente Bindung durch die scFv-Fc Fusionsproteine ermöglicht wurde [134]. Bei der Bindungsanalyse im monoklonalen ELISA zeigten nur sechs der neun analysierten Fusionsproteine eine Bindeaktivität (Klon 3B, 6B, 2C, 1E, 3E und 6E; Abb. 18), obwohl bei allen eine eindeutige Bindung als scFv-Phagen dokumentiert wurde (Abb. 15). Besonders deutlich war dieser Unterschied bei den Klonen 11D und 3G, welche zuvor auf Phagenebene eine starke Bindeaktivität zeigten, die jedoch als scFv-Fc Fusionsprotein nicht bestätigt werden konnte. Dieses Phänomen ist bereits in der Literatur beschrieben, der genaue Grund ist jedoch unbekannt [46, 164]. Eine mögliche Erklärung könnte eine geringere Löslichkeit der scFv's ohne Phagen sein oder dass die Phagenpartikel die Antikörper stabilisieren [46]. Es könnte aber auch an einer veränderten Faltung der Fusionsproteine nach Expression gelegen haben. Die Absorptionssignale der Klone 3B und 2C waren auf Phagenebene ebenfalls deutlich stärker (3,4-fach bzw. 7,1-fach). Ein weiterer möglicher Grund könnte die polyklonale Darstellung der scFv's durch Verwendung von Hyperphagen sein [164]. Hierdurch präsentierte jeder Phagenpartikel an allen fünf pIII Schwanzproteinen einen scFv, wohingegen die Fc Fusionsproteine als Dimere vorlagen. Durch die polyvalente Darstellung der scFv's am Hyperphagen könnte durch die zusätzliche Avidität eine stärkere Bindung stattgefunden haben, die bei den scFv-Fc Fusionsproteinen auf Grund der geringeren Avidität nicht oder nur geringer detektiert wurde. Außerdem ist der im Phagen-ELISA verwendete anti-M13 Antikörper gegen das Haupthüllprotein pVIII gerichtet, welches ca. 2.700-mal auf der Phagenoberfläche vorkommt. Hierdurch kommt es zu einer Amplifikation des Absorptionssignals [164]. Im Vergleich dazu wurde für die Detektion der scFv-Fc Fusionsproteine ein anti-Maus Sekundärantikörper verwendet, der am Fc-Teil bindet.

Die Bindungsanalysen an vitalen Zellen im Durchflusszytometer (Abb. 19) bestätigten die Ergebnisse der monoklonalen ELISA's. Hier zeigten die sechs positiven Klone erneut eine Bindeaktivität zu den drei verwendeten SCLC Zelllinien. Die ELISA-negativen Klone 3A und 11D erwiesen sich erneut als negativ, lediglich von Klon 3G wurde in der Durchflusszytometrie eine schwache Bindeaktivität dokumentiert, die im ELISA nicht beobachtet wurde. Durch die Durchflusszytometrie wurde außerdem gezeigt, dass die auf „totem“ FFPE-Material selektionierten Binder in der Lage waren, vitale Zellen zu erkennen. Des Weiteren konnte auf Grund der negativen Klone davon ausgegangen werden, dass es sich bei der gemessenen Bindeaktivität der positiven Klone um eine spezifische, antikörperabhängige Bindung handeln musste und diese nicht durch unspezifische Bindung des Fc-Teils zustande kam. Anderenfalls hätten alle Fc Fusionsproteine eine Bindeaktivität zeigen müssen.

Für die Umwandlung in Fab-Fragmente wurden die Klone 3A, 3B, 6B, 1E, 3E und 6E ausgewählt. Hierbei handelte es sich um die vielversprechendsten Binder, die sowohl im ELISA, als auch in der Durchflusszytometrie eine starke Bindeaktivität zu SCLC zeigten. Lediglich bei Klon 3A wurde in

beiden Analysen als Fc-Fusionsprotein keine Bindung dokumentiert. Durch die Herstellung als Fab-Fragment sollte bei diesem Klon überprüft werden, ob durch die Umwandlung des Antikörperformats die auf Phagenebene gemessene Bindung bestätigt werden konnte. Erneut wurde von Klon 3A keine Bindeaktivität dokumentiert, so dass dieser sowohl als scFv-Fc Fusionsprotein als auch als Fab-Fragment keine Bindung zu SCLC-Zellen zeigte. Die Umwandlung des Formats hatte daher keinen positiven Effekt auf die Bindeaktivität. Bei den anderen fünf Klonen konnte die Bindeaktivität als Fab-Fragment nochmals bestätigt werden (Abb. 23). Jedoch wurde bei 1E als Fab-Fragment eine etwas geringere Bindeaktivität im Vergleich zu 1E als Fc Fusionsprotein beobachtet, weshalb die Zellverschiebung in der Durchflusszytometrie von 83 % als scFv-Fc auf 66 % als Fab-Fragment abnahm. Daher wurde dieser Klon als Fab-Fragment als moderater Binder (Zellverschiebung zwischen 50 und 70 %) eingeordnet. Eine noch geringere Bindeaktivität wurde bei den Klonen 6B und vor allem 6E gemessen. Hierdurch fiel die Zellverschiebung unter 50 %, weshalb die Klone als Fab-Fragmente in schwache Binder eingestuft wurden. Erneut könnte der Grund hierfür eine veränderte Faltung durch die Umwandlung des Antikörperformats sein. Bei den anderen drei Klonen wurde als Fab-Fragmente eine ähnliche Bindeaktivität wie als Fc Fusionsprotein dokumentiert. Allerdings lassen sich die gemessenen Signale nicht ohne weiteres mit einander vergleichen, da die Detektion der Bindung über unterschiedliche Sekundärantikörper erfolgte (gam-FITC bzw. anti-Fab Biotin und SA/PE). Zusätzlich wurden die Fab-Fragmente auf Kreuzreaktivität zu SCLC-irrelevanten PBMC's, der NK-Zell-abgeleiteten Zelllinie NK92-C1 und der ALL-Zelllinie NALM-6 untersucht. Da ein möglicher therapeutischer Einsatz der selektionierten Antikörper intravenös erfolgen würde, wurden für die Kontrollen Blut- (PBMC's und NALM-6) bzw. Immunzellen (NK92-C1), mit denen die Antikörper bei Therapie in Kontakt kämen, eingesetzt. Keiner der Klone zeigte hierbei eine Kreuzreaktivität zu den Kontrollzellen, weshalb von einer spezifischen SCLC-Bindung ausgegangen werden konnte.

Zur weiteren Bestätigung der Spezifität und zur Untersuchung eines möglichen diagnostischen Einsatzes wurden die drei Fab-Fragmente 3B, 3E und 6E zur immunhistochemischen Färbung von Geweben eingesetzt. Nach Etablierung der optimalen Färbebedingungen erfolgte die Färbung von Tissue Microarrays mit 35 verschiedenen SCLC-Fällen unterschiedlicher Tumorstadien und 20 verschiedenen gesunden Organen. Hierbei zeigten alle drei Fab-Fragmente eine starke Färbung der SCLC Biopsate, wobei die Färbeintensität unabhängig vom Tumorstadium war. Auf den 20 gesunden Organen wurde keine, oder nur eine minimale Kreuzreaktivität beobachtet (Abb. 25). Bei den angefärbten Bereichen in den Normalgeweben handelte es sich zum Teil um neuroendokrine Bereiche, wie zum Beispiel die β -Zellen der Langerhansschen-Inseln im Pankreas. Da SCLC ebenfalls neuroendokrinen Ursprungs ist [165, 166], könnten hier strukturell ähnliche Motive angefärbt worden sein, die sowohl auf den neuroendokrinen β -Zellen als auch auf SCLC vorkommen [167, 168]. Die Färbung auf SCLC Gewebe war jedoch viel intensiver als die der Langerhansschen-Inselzellen,

daher ist davon auszugehen, wenn es sich um ein kreuzreaktives Antigen auf beiden Zelltypen handelt, dass dieses auf SCLC-Zellen wesentlich stärker exprimiert wird und es sich somit um ein tumorassoziiertes Antigen (TAA) handeln könnte [13]. Ein weiterer Grund für die minimale Kreuzreaktivität könnte endogenes Biotin (Vitamin H) sein, welches in vielen Geweben (vor allem in Leber, Niere und adipösem Gewebe) vorkommt [169]. Die Detektion der Fab-Fragmente erfolgte über einen biotinylierten anti-Fab Antikörper, gefolgt von einem HRP-markiertem Avidin-Biotin-Komplex (ABC). Dieser Avidin-Biotin Komplex könnte unabhängig vom Fab-Fragment und dem biotinylierten anti-Fab Antikörper an das endogene Biotin gebunden und so für die unspezifische Farbreaktion gesorgt haben [170]. Durch eine hitzeinduzierte Antigendemaskierung kann dieser Effekt zusätzlich verstärkt werden [171]. Außerdem kann es zu unspezifischer Adhärenz des Avidin durch elektrostatische Interaktionen mit dem Gewebe kommen [170]. Eine Möglichkeit zur Verhinderung dieser endogenen Avidin-Biotin Aktivität (EABA) ist die Blockierung des endogenen Biotins vor Zugabe des Primäantikörpers. Hierdurch hätte die beobachtete Farbreaktion an gesundem Gewebe eventuell verhindert oder weiter minimiert werden können. Da die Kreuzreaktivität jedoch minimal und bei den meisten gesunden Organen gar keine Anfärbung vorhanden war, wurde auf eine Blockierung des endogenen Biotins verzichtet.

Aktuell werden bei der immunhistochemischen Diagnose von SCLC die neuroendokrinen Marker Chromogranin, Synaptophysin und CD56 gefärbt, wobei nur in weniger als 10 % der Fälle alle drei Marker negativ sind. Zusätzlich werden der Thyroidale Transkriptionsfaktor 1 (TTF-1), der in 90 % der Fälle positiv ist, sowie Cytokeratin 7 und 20 gefärbt [172, 173]. Dennoch ist die Unterscheidung zwischen SCLC, gering differenziertem NSCLC und Metastasen anderer neuroendokriner Tumore teilweise schwierig [172]. Bei der Differenzialdiagnose könnte daher eine zusätzliche Färbung mit den hier selektionierten Bindern hilfreich sein. Voraussetzung für den diagnostischen Einsatz ist jedoch die Kenntnis des Antigens der Binder. Ohne diese Kenntnis ist eine Zulassung für die *in vitro* Diagnose nicht möglich.

Obwohl die rekombinanten Antikörperfragmente nach ihrer Produktion über ein poly-His Tag mittels IMAC aufgereinigt wurden, waren in den Coomassie-Färbungen Verunreinigungen durch bakterielle Proteine zu sehen (Abb. 22, Abb. 26). Dies ist ein bekanntes Problem bei der Verwendung von IMAC, da diese bakteriellen Proteine auch an das immobilisierte Metall oder an die Matrix binden können [117, 174]. Die Proteine besitzen entweder ebenfalls Histidincluster in ihrer Aminosäuresequenz, natürliche Metall-bindende Motive oder binden an die rekombinanten Antikörperfragmente. Durch weitere Aufreinigungsschritte, wie eine Größenausschluss- („size exclusion chromatography“, SEC) oder Ionenaustauschchromatographie („ion-exchange chromatography“, IEX) oder über ein weiteres Tag, hätte die Reinheit der rekombinanten Antikörperfragmente weiter erhöht werden können [117].

Da die Reinheit für die durchgeführte Charakterisierung der selektionierten Binder jedoch ausreichend war, wurde auf weitere Aufreinigungsschritte verzichtet.

5.4 Therapeutischer Einsatz der rekombinanten Immuntoxine

Für einen möglichen therapeutischen Einsatz der selektionierten Antikörperfragmente wurden Immuntoxine durch Fusion der Antikörperfragmente an eine verkürzte Form des *Pseudomonas* Exotoxin A (ETA') hergestellt. Wichtige Voraussetzung für einen zytotoxischen Effekt von Immuntoxinen ist die effiziente Aufnahme durch die Zielzelle, damit das Toxin ins Zellinnere zu seinem Wirkort gelangen kann [67]. Daher wurde zunächst das Internalisierungsverhalten der drei Klone 3B, 3E und 6E als Fc Fusionsproteine in der Durchflusszytometrie und im Konfokalmikroskop untersucht. Für die Durchflusszytometrie-basierte Untersuchung wurden die DMS 273 Zellen zunächst bei 4 °C mit den Fc Fusionsproteinen inkubiert und anschließend eine Aufnahme der Antikörper durch die Zielzelle bei 37 °C ermöglicht, bevor die Detektion mittels gam-FITC Sekundärantikörper bei 4 °C erfolgte. Die gemessenen Fluoreszenzsignale wurden mit durchgehend bei 4 °C inkubierten DMS 273 Zellen verglichen. Alle drei Antikörperfragmente zeigten hierbei eine Abnahme des Fluoreszenzsignals und damit eine intrazelluläre Aufnahme durch die Zellen. Am effizientesten wurde 3B internalisiert (65 % nach 15 min). 3E wurde ebenfalls schon nach kurzer Zeit von den Zellen aufgenommen (55 % nach 60 min), wohingegen 6E erst nach 240 min zu über 50 % internalisiert wurde (Abb. 20). Hierbei ist jedoch zu beachten, dass das verringerte Fluoreszenzsignal nicht ausschließlich durch Internalisierung der Antikörper zustande gekommen sein könnte. Zusätzlich könnte es zu einer Abnahme des Signals durch stärkere Dissoziation („off-rate“) der gebundenen Antikörper bei 37 °C als bei 4 °C gekommen sein, oder durch ein erhöhtes Abwerfen („shedding“) des Antigens durch die Zielzelle bei 37 °C [175]. In der Konfokalmikroskopie konnte die Internalisierung der Antikörper bei 37 °C jedoch eindeutig nachgewiesen werden (Abb. 21). Erneut wurde eine starke endozytische Aufnahme der Fc-Fusionsproteine 3B und 3E dokumentiert, während 6E wie schon in der Durchflusszytometrie ineffizient aufgenommen wurde. Ein Grund für das schlechtere Internalisierungsverhalten von 6E könnte das entsprechende Epitop von 6E sein, welches nach Antikörperbindung möglicherweise nur eine schwache Endozytose induziert.

Nach Fusion der drei scFv's an das ETA'-Toxin wurde zunächst das Bindungsverhalten der rekombinanten Immuntoxine (IT) auf DMS 273 Zellen im Durchflusszytometer untersucht. Alle drei IT zeigten eine starke Bindeaktivität, wobei diese erneut bei 6E am geringsten war. Bei der Zytotoxizitätsanalyse wurde sowohl von 3B als auch 3E ein proliferationshemmender Effekt auf allen drei SCLC Zelllinien dokumentiert. Die IC₅₀-Werte lagen mit 22,94 ± 4,63 nM von 3B und 21,28 ± 1,70 nM von 3E in einem ähnlichen Bereich. Von 6E konnte nur ein geringer inhibitorischer Effekt von

20 % auf NCI-H69 und 35 % auf DMS 273 beobachtet werden und auch nur in der höchsten eingesetzten Konzentrationen (95 nM). Da eine Bindung von 6E-ETA' nachgewiesen wurde, könnte die mangelnde Zytotoxizität möglicherweise auf die beobachtete ineffiziente Internalisierung durch die Zielzellen zurückgeführt werden. Des Weiteren ist die zytotoxische Wirkung von der Expression des Zielantigens auf der Zelloberfläche abhängig [176]. Da bei den Bindungsanalysen von 6E-ETA' eine geringere Bindeaktivität gemessen wurde als bei den beiden anderen IT, könnte das Antigen von 6E auf den SCLC Zelllinien in geringerer Konzentration exprimiert worden sein. Hierdurch könnte es ebenfalls zu einer geringeren Toxizität gekommen sein. Ein weiterer Schlüsselfaktor für die zytotoxische Wirksamkeit eines IT ist neben der Internalisierung und der Antigenexpression auch der Transport und die korrekte Freisetzung der katalytischen Domäne innerhalb der Zielzelle [75]. Hier könnte ein weiterer möglicher Grund für die geringe Wirksamkeit von 6E-ETA' begründet liegen, da es eventuell zu einem lysosomalen Abbau von 6E-ETA' gekommen sein könnte [177]. Für die zytotoxische Wirkung von ETA' muss die katalytische Domäne ins Zytosol der Zelle gelangen [76]. Hierfür wird das Toxin zunächst zum Endoplasmatischen Retikulum (ER) transportiert, bevor es zur Translokation ins Zytosol kommt [74]. Bei gegebenenfalls vorzeitigem Abbau des Toxins durch das Lysosom bleibt dieses wirkungslos.

In der Literatur sind je nach Antikörperfragment verschiedene IC_{50} -Werte von ETA'-basierten IT beschrieben [123, 178-180]. Diese liegen teilweise im picomolaren Bereich und damit unterhalb der in dieser Arbeit erzielten Werte. Durch eine Affinitätsreifung der Antikörper mittels „*error-prone*“-PCR oder Zufallsmutagenese der CDR kann die zytotoxische Wirkung der Immuntoxine erhöht und somit der IC_{50} -Wert deutlich verbessert werden. So konnten beispielsweise Kawa *et al.* durch Veränderung der variablen Domäne die Zytotoxizität um das 10-fache [181] und Kuan *et al.* sogar um das 60-fache steigern [182]. Des Weiteren berichten Piao *et al.* von einem verbesserten Internalisierungsverhalten und daraufhin von einem vor der Reifung nicht beobachteten zytotoxischen Effekt nach Affinitätsreifung [183]. Zusätzlich lässt sich die Zytotoxizität durch Veränderung des ETA'-Toxins steigern. So führte das Einfügen des ER Erkennungsmotivs KDEL an den C-Terminus zu einer erhöhten Toxizität, da es zu einem effizienteren Transport des Toxins zum ER kommt [184-186]. Veränderungen in der Translokationsdomäne können ebenfalls zu einer erhöhten Toxizität beitragen, da hierdurch die Ausbildung der korrekten Konformation des Toxins in den endosomalen Vesikeln der Zielzelle und damit die Translokation der Effektdomäne begünstigt wird [187].

Nach Verifizierung der proliferationshemmenden Wirkung der drei rekombinanten Immuntoxine wurde zum Nachweis der Apoptoseinduktion in SCLC Zellen eine Annexin V/7AAD Doppelfärbung durchgeführt. Hierbei konnte eine proapoptotische Wirkung von 3B- und 3E-ETA' bestätigt werden. Bei 6E-ETA' wurde auch in diesem Assay kein Effekt im Vergleich zu PBS-behandelten Zellen

beobachtet. Annexin V bindet an Phosphatidylserin, welches sich bei intakten Zellen auf der intrazellulären Membranseite befindet. Einer der ersten Veränderungen in apoptotischen Zellen ist der Verlust der Membranasymmetrie, wodurch PS auf die extrazelluläre Seite gelangt [129]. Annexin V dient daher zum Nachweis von früher Apoptose. Um sicher zu stellen, dass die Zellen anschließend auch tatsächlich in Apoptose gehen und nicht durch einen anderen Mechanismus (z.B. Nekrose) absterben, wird häufig noch ein weiterer Assay zum Nachweis der späten Apoptose, wie z.B. ein TUNEL- oder ein Caspase-Assay, durchgeführt. Da in der Literatur jedoch bereits in zahlreichen Publikationen die Induktion von Apoptose durch ETA'-basierte Immuntoxine beschrieben ist [122, 123, 137, 188], wurde in dieser Arbeit auf weitere Apoptose-Assays verzichtet.

Sowohl bei den Viabilitäts- als auch bei den Apoptose-Assays wurde das irrelevante IT H22-ETA', welches spezifisch CD64 erkennt [189, 190], als Kontrolle eingesetzt. Hierdurch sollte die Wirkung von ETA' ohne zielgerichteten Transport untersucht werden. Es konnte kein proliferationshemmender oder proapoptotischer Einfluss dokumentiert werden, weshalb der beobachtete Effekt von 3B- und 3E-ETA' in jedem Fall antikörperabhängig war. Dies wurde durch die Wirkungslosigkeit von 6E-ETA' ebenfalls bestätigt. Das ETA' Toxin alleine wurde nicht von den SCLC Zellen internalisiert und löste daher keinen Effekt aus. Dies ist besonders wichtig für einen möglichen therapeutischen Einsatz der IT, da hierdurch die Gefahr von unerwünschten Nebenwirkungen reduziert wird.

Bei ETA' handelt es sich um ein potentes Toxin, welches jedoch prokaryotischen Ursprungs ist. Auf Grund dessen kann es nach Administration im Zielorganismus zu unerwünschten Immunreaktionen kommen, vor allem bei wiederholter Gabe [89]. Hierdurch kann es, ähnlich wie bei den in der Einleitung beschriebenen HAMA Effekten, zur Neutralisation der IT oder zu allergischen Reaktionen kommen, wodurch der therapeutische Einsatz limitiert wird. Das Immunsystem des Zielorganismus reagiert dabei auf die B- und T-Zell Epitope des Toxins. Diese unerwünschten Immunreaktionen können daher durch die Verwendung von modifizierten Formen des ETA' Toxins, bei denen die immunogenen Epitope entfernt wurden, verhindert werden [77-79]. Eine weitere Möglichkeit zur Verhinderung von unerwünschten Immunreaktionen ist die Verwendung von humanen, proapoptotischen Proteinen, wie z.B. Tau [191], DAPK2 [192], RNAsen [193], Granzyme B [84] oder Granzyme M [85]. Auf Grund der hohen zytotoxischen Potenz von ETA' und der häufigen Verwendung als rekombinantes Immuntoxin [176] wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst das zytotoxische Potential der selektionierten Antikörperfragmente durch Fusion an ETA' untersucht. Nachdem das zytotoxische Potential von 3B und 3E verifiziert wurde, sind zukünftig auch Fusionen mit humanen Proteinen denkbar.

5.5 Antigenidentifizierung

Die durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass einige der selektierten Antikörper sowohl für einen diagnostischen (Immunhistochemie, Durchflusszytometrie, ELISA), als auch therapeutischen Einsatz (internalisierende Antikörper als Immuntoxin, nicht-internalisierende als Radioimmunkonjugate oder bispezifische Konstrukte) in Frage kommen. Ohne die Kenntnis der Antigene ist ein Einsatz jedoch sehr unwahrscheinlich, da das Risiko falscher Diagnosen oder unerwünschter Nebenwirkungen zu groß ist. Die bisherigen Bemühungen zur Identifikation der Antigene blieben jedoch erfolglos. Die Antigene sollten zunächst durch die selektierten Antikörper spezifisch im Western Blot nachgewiesen und anschließend mit Hilfe der Massenspektroskopie analysiert werden. Allerdings konnten hierbei im Western Blot sowohl mit SCLC Zelllysaten, als auch Membranfragmenten, keine spezifischen, immunreaktiven Banden nachgewiesen werden. Eine Analyse der erhaltenen Banden mit Hilfe der Massenspektroskopie ergab keine passenden Treffer. So handelte es sich hauptsächlich um Proteine des Zytoskeletts oder der Mitochondrien, die auf Grund ihrer Größe und Struktur bei der Herstellung der Membranfragmente ebenfalls isoliert wurden. Auf Grund der Bindungsanalysen im Durchflusszytometer ist allerdings davon auszugehen, dass es sich um Oberflächenantigene handeln muss, da intrazelluläre Antigene erst durch Permeabilisierung der Zellen zugänglich werden [194]. Die Abnahme der Bindung nach Trypsinbehandlung weist zusätzlich darauf hin, dass es sich um Trypsin-sensitive Oberflächenproteine handeln muss und daher Glykolipide ausgeschlossen werden können. Versuche, die Antigene mittels 2D-Gelelektrophorese (isoelektrische Fokussierung und SDS-PAGE) aufzutrennen und anschließend zu analysieren, blieben ebenfalls erfolglos, da in der 2D-Gelelektrophorese keine Banden dokumentiert werden konnten. Hierbei könnten die Antigene während der isoelektrischen Fokussierung präzipitiert sein, weshalb sie im anschließenden Gel nicht mehr nachgewiesen werden konnten [195, 196]. Generell ist die Isolation von Membranproteinen auf Grund ihrer hydrophoben Eigenschaften und der damit verbundenen schlechten Löslichkeit schwierig, da sie häufig beim Trennen aus der Membran ausfallen [197, 198]. Eine Solubilisierung der Membranproteine ist allerdings Voraussetzung für die weitere Analyse. Auch erste Versuche, die Antigene mittels Immunpräzipitation zu identifizieren, blieben bisher erfolglos.

6 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine neue Selektionsstrategie zur Generierung spezifischer Antikörperfragmente mittels Phage Display Technologie entwickelt. Die *On Slide* Selektion ermöglicht dabei den Einsatz von Routine FFPE Patientenmaterial als Antigen, um krankheitsrelevante Antikörper zu selektionieren. Die Etablierung der Methode erfolgte hierbei auf SCLC Biopsaten, wobei zahlreiche neue, spezifische Antikörperfragmente generiert wurden. Als nächstes soll untersucht werden, ob die *On Slide* Selektion auch bei anderen Tumorentitäten zur Antikörpergenerierung eingesetzt werden kann. Da es sich bei SCLC um eine solide Tumorentität handelt, sollen hierfür Beckenstanzen von hämatologische Erkrankungen, wie der akuten myeloischen Leukämie (AML) und der akuten lymphatischen Leukämie (ALL), als Ausgangsmaterial verwendet werden. Hierdurch soll überprüft werden, ob sich auch Gewebe von nicht-soliden Tumoren für die *On Slide* Selektion eignen. Neben der Selektion von Tumor-spezifischen Antikörpern ist eine Selektion auf nicht-malignen Erkrankungen, wie z.B. chronischen Entzündungen, ebenfalls denkbar. Hier könnten Antikörper gegen inflammatorische Zellen oder zur Neutralisation von Entzündungsmediatoren selektioniert werden.

Die Charakterisierung der selektionierten Antikörper hat gezeigt, dass sowohl ein diagnostischer (ELISA, Immunhistochemie, Durchflusszytometrie) als auch ein therapeutischer (Immuntoxin) Einsatz möglich ist. Die Kenntnis der jeweiligen Antigene ist hierfür jedoch essentiell. Aus diesem Grund soll eine Immunpräzipitation für eine anschließende massenspektrometrische Analyse in der Abteilung etabliert werden. Die Antikörper sollen dabei an eine Matrix oder magnetische Beads kovalent gekoppelt und anschließend die entsprechenden Antigene aus Zelllysat von SCLC Zellen isoliert werden. Nach Elution der Antigene können diese mittels Western Blot und anschließender Massenspektroskopie identifiziert und mit einer Proteindatenbank verglichen werden. Dieser Ansatz wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen demonstriert [63, 106, 199]. Bei erfolgreicher Etablierung der Immunpräzipitation und Antigenidentifizierung ließe sich die *On Slide* Selektion, neben der Generierung diagnostischer und therapeutischer Antikörper, ebenfalls für die Identifikation neuer, tumorassoziierter und tumorspezifischer Antigene (TAA und TSA) auf malignem Gewebe anwenden. Hierdurch könnten bisher unbekannte Strukturen und Targets auf Tumoren aufgespürt werden.

Nachdem durch die Proliferations- und Apoptose-Assays ein zytotoxischer Effekt der Immuntoxine 3B- und 3E-ETA' *in vitro* gezeigt werden konnte, soll dieser Effekt als nächstes *in vivo* verifiziert werden. *In vivo* Untersuchungen liefern wichtige Informationen über die Wirksamkeit von neuen Therapeutika im Organismus, deren Verträglichkeit, Serumstabilität und Bioverfügbarkeit. Hierbei soll ein orthotopes Xenograft Mausmodell mit den tumorigenen DMS 273 Zellen etabliert werden. Die

Zellen sollen hierfür vor intravenöser Applikation mit einem Luciferasegen transfiziert werden, so dass eine nicht-invasive Visualisierung des Tumorwachstums und der Tumorverteilung im Organismus durch Applikation von Luciferin und anschließendem Biolumineszenz Imaging (BLI) ermöglicht wird [200, 201]. Nach Überprüfung der Transfektion und Sortieren der Zellen im FACS sollen diese den Mäusen intravenös über die Schwanzvene appliziert werden. Bei erfolgreichem Anwachsen der Tumore sollen verschiedene Therapievarianten (Optimaler Startpunkt der Therapie, Dosierung, einmalige oder wiederholte Applikation) analysiert werden. Erste Transfektionen der DMS 273 Zellen wurden hierfür bereits durchgeführt.

Der Erfolg einer Therapie und das Auftreten von Nebenwirkungen unterscheiden sich zum Teil stark zwischen Patienten, trotz gleicher Tumorerkrankung [61]. Aus diesem Grund steigt das Interesse an personalisierter Medizin, die auf den einzelnen Patienten oder Patientengruppen zugeschnitten ist. Die *On Slide* Selektion könnte zukünftig in diesem Bereich zum Einsatz kommen, indem anhand der Biopsien eines Patienten individuelle Antikörper generiert werden könnten. Hierdurch könnte eine größere therapeutische Wirksamkeit erzielt werden, da die Antikörper gegen Antigene gerichtet sind, die bei der Erkrankung des jeweiligen Patienten definitiv präsent sind. Hierfür müsste ein Hochdurchsatz-Screening („*high throughput screening*“, HTS) zur Charakterisierung der selektionierten Antikörper entwickelt werden, um deren Eignung als Therapeutikum schnell und kostengünstig zu verifizieren. Allerdings könnten aktuell vor allem die Kosten limitierend für den Einsatz in der personalisierten Medizin sein.

Anhang

Mutageneseprimer

Die nachfolgenden Primer wurden bei der ortsgerichteten Mutagenese verwendet, um die amber Stopcodons (TAG) in den scFv-Genfragmenten gegen die Aminosäure Glutamin (CAG) auszutauschen (3.4.6).

Bezeichnung	Sequenz
3A 3' rc	CTG CGT ACT GTG TCT gCG AAC CCT GAT GCG TAA TC
3A 5'	GAT TAC GCA TCA GGG TTC GcA GAC ACA GTA CGC AG
3B 3' rc	GTC TTC AGA CCC CAC TgA GAA ATA GTT GAG ACC CAC
3B 5'	GTG GGT CTC AAC TAT TTC TcA GTG GGG TCT GAA GAC
6B 3' rc	CAC GGA GTC TGC GTA CTg TGT CCT CAT ACC ACG CCG
6B 5'	CGG CGT GGT ATG AGG ACA cAG TAC GCA GAC TCC GTG
2C 3' rc	GAT GTA TGA CCA CCC TgC CTC GTA ATC GAT GAG AC
2C 5'	GTC TCA TCG ATT ACG AGG cAG GGT GGT CAT ACA TC
3C 3' rc	CTG CGT ACT GTG TCT gCG CAC CAG GAT GAG TAA TAG
3C 5'	CTA TTA CTC ATC CTG GTG CGc AGA CAC AGT ACG CAG
8D 3' rc	CAG GGA CCC CCC AGG CTg TAC CAA GCC TCC CCC AG
8D 5'	CTG GGG GAG GCT TGG TAc AGC CTG GGG GGT CCC TG
11D 3' rc	CAC GGA GTC TGC GTA CTg TGT AGT ACT ACC ATT ATG
11D 5'	CAT AAT GGT AGT ACT ACA cAG TAC GCA GAC TCC GTG
1E 3' rc	CTG CGT AAC GTG TAC GCT gAC CAT GAT TAG TAA TC
1E 5'	GAT TAC TAA TCA TGG TcA GCG TAC ACG TTA CGC AG
3E 3' rc	CAC GGA GTC TGC GTA CTg TGT AGA AGC ACC AGT CCG
3E 5'	CGG ACT GGT GCT TCT ACA cAG TAC GCA GAC TCC GTG
6E 3' rc	CTT TGT ATG CTG ACC CTg CCC AGA AAT ACG TGA GAC
6E 5'	GTC TCA CGT ATT TCT GGG cAG GGT CAG CAT ACA AAG
3G 3' rc	GTC AAA CCA CCA GAC TgA GAA ATA GTT GAG ACC CAC
3G 5'	GTG GGT CTC AAC TAT TTC TcA GTC TGG TGG TTT GAC

Literaturverzeichnis

1. Janeway, C.A., et al., *Immunobiology - The Immune System in Health and Disease*, ed. edition. 2001, New York: Garland Science.
2. Martin, M. and K. Resch, *Immunologie*. 2009, Stuttgart: UTB Basics.
3. Stewart, A.K. and R.S. Schwartz, *Immunoglobulin V regions and the B cell*. *Blood*, 1994. **83**(7): p. 1717-30.
4. Strebhardt, K. and A. Ullrich, *Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress*. *Nat Rev Cancer*, 2008. **8**(6): p. 473-80.
5. Scott, A.M., J.D. Wolchok, and L.J. Old, *Antibody therapy of cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2012. **12**(4): p. 278-87.
6. Kohler, G. and C. Milstein, *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. *Nature*, 1975. **256**(5517): p. 495-7.
7. Waldmann, T.A., *Monoclonal antibodies in diagnosis and therapy*. *Science*, 1991. **252**(5013): p. 1657-62.
8. Hust, M., et al., *A human scFv antibody generation pipeline for proteome research*. *J Biotechnol*, 2011. **152**(4): p. 159-70.
9. Goldenberg, D.M., *Monoclonal antibodies in cancer detection and therapy*. *Am J Med*, 1993. **94**(3): p. 297-312.
10. Hudson, P.J. and C. Souriau, *Recombinant antibodies for cancer diagnosis and therapy*. *Expert Opin Biol Ther*, 2001. **1**(5): p. 845-55.
11. Jones, P.T., et al., *Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse*. *Nature*, 1986. **321**(6069): p. 522-5.
12. Riechmann, L., et al., *Reshaping human antibodies for therapy*. *Nature*, 1988. **332**(6162): p. 323-7.
13. Harris, M., *Monoclonal antibodies as therapeutic agents for cancer*. *Lancet Oncol*, 2004. **5**(5): p. 292-302.
14. Lonberg, N. and D. Huszar, *Human antibodies from transgenic mice*. *Int Rev Immunol*, 1995. **13**(1): p. 65-93.
15. Jakobovits, A., *Production of fully human antibodies by transgenic mice*. *Curr Opin Biotechnol*, 1995. **6**(5): p. 561-6.
16. Paul-Ehrlich-Institut, *Liste zugelassener monoklonaler Antikörper*. 2014.
17. ClinicalTrials.gov, *monoclonal antibodies*. 2014.
18. Reichert, J.M., *Which are the antibodies to watch in 2013?* *MAbs*, 2013. **5**(1): p. 1-4.
19. Hansel, T.T., et al., *The safety and side effects of monoclonal antibodies*. *Nat Rev Drug Discov*, 2010. **9**(4): p. 325-38.
20. Hoogenboom, H.R., *Selecting and screening recombinant antibody libraries*. *Nat Biotechnol*, 2005. **23**(9): p. 1105-16.
21. Barbas, C.F., 3rd, et al., *Phage Display - A Laboratory Manual*. 2001, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
22. Smith, G.P., *Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface*. *Science*, 1985. **228**(4705): p. 1315-7.
23. Huse, W.D., et al., *Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda*. *Science*, 1989. **246**(4935): p. 1275-81.
24. Deng, L.W., P. Malik, and R.N. Perham, *Interaction of the globular domains of pIII protein of filamentous bacteriophage fd with the F-pilus of Escherichia coli*. *Virology*, 1999. **253**(2): p. 271-7.
25. Boeke, J.D., P. Model, and N.D. Zinder, *Effects of bacteriophage f1 gene III protein on the host cell membrane*. *Mol Gen Genet*, 1982. **186**(2): p. 185-92.

26. Jespers, L.S., et al., *Surface expression and ligand-based selection of cDNAs fused to filamentous phage gene VI*. Biotechnology (N Y), 1995. **13**(4): p. 378-82.
27. Gao, C., et al., *Making artificial antibodies: a format for phage display of combinatorial heterodimeric arrays*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(11): p. 6025-30.
28. Harrison, J.L., et al., *Screening of phage antibody libraries*. Methods Enzymol, 1996. **267**: p. 83-109.
29. Bird, R.E., et al., *Single-chain antigen-binding proteins*. Science, 1988. **242**(4877): p. 423-6.
30. Carmen, S. and L. Jermutus, *Concepts in antibody phage display*. Brief Funct Genomic Proteomic, 2002. **1**(2): p. 189-203.
31. Marks, J.D., et al., *By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage*. J Mol Biol, 1991. **222**(3): p. 581-97.
32. Ling, M.M., *Large antibody display libraries for isolation of high-affinity antibodies*. Comb Chem High Throughput Screen, 2003. **6**(5): p. 421-32.
33. Dantas-Barbosa, C., M.M. Brigido, and A.Q. Maranhao, *Construction of a human Fab phage display library from antibody repertoires of osteosarcoma patients*. Genet Mol Res, 2005. **4**(2): p. 126-40.
34. Tomlinson, I. and G. Winter, *Method to screen phage display libraries with different ligands*. 2005: United States.
35. Yang, H.Y., et al., *Construction of a large synthetic human scFv library with six diversified CDRs and high functional diversity*. Mol Cells, 2009. **27**(2): p. 225-35.
36. Knappik, A., et al., *Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides*. J Mol Biol, 2000. **296**(1): p. 57-86.
37. Virnekas, B., et al., *Trinucleotide phosphoramidites: ideal reagents for the synthesis of mixed oligonucleotides for random mutagenesis*. Nucleic Acids Res, 1994. **22**(25): p. 5600-7.
38. Ponsel, D., et al., *High affinity, developability and functional size: the holy grail of combinatorial antibody library generation*. Molecules, 2011. **16**(5): p. 3675-700.
39. Schirrmann, T., et al., *Phage display for the generation of antibodies for proteome research, diagnostics and therapy*. Molecules, 2011. **16**(1): p. 412-26.
40. Qin, W., et al., *A novel technique for efficient construction of large scFv libraries*. Mol Biotechnol, 2007. **37**(3): p. 201-5.
41. Jung, S., et al., *Selectively infective phage (SIP) technology: scope and limitations*. J Immunol Methods, 1999. **231**(1-2): p. 93-104.
42. de la Cruz, V.F., A.A. Lal, and T.F. McCutchan, *Immunogenicity and epitope mapping of foreign sequences via genetically engineered filamentous phage*. J Biol Chem, 1988. **263**(9): p. 4318-22.
43. Li, B., et al., *In vitro affinity maturation of a natural human antibody overcomes a barrier to in vivo affinity maturation*. MAbs, 2014. **6**(2): p. 437-45.
44. Holt, L.J., et al., *The use of recombinant antibodies in proteomics*. Curr Opin Biotechnol, 2000. **11**(5): p. 445-9.
45. Tomlinson, I. *Human Single Fold scFv Libraries I + J (Tomlinson I + J) Protocol*. Available from: <http://lifesciences.sourcebioscience.com/media/143421/tomlinsonij.pdf>.
46. Lee, C.M., et al., *Selection of human antibody fragments by phage display*. Nat Protoc, 2007. **2**(11): p. 3001-8.
47. Suzuki, I., et al., *Representation of rearranged VH gene segments in the human adult antibody repertoire*. J Immunol, 1995. **154**(8): p. 3902-11.
48. Milner, E.C., et al., *Polymorphism and utilization of human VH Genes*. Ann N Y Acad Sci, 1995. **764**: p. 50-61.
49. Ewert, S., et al., *Biophysical properties of human antibody variable domains*. J Mol Biol, 2003. **325**(3): p. 531-53.
50. Cwirla, S.E., et al., *Peptides on phage: a vast library of peptides for identifying ligands*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(16): p. 6378-82.

51. de Wildt, R.M., et al., *Antibody arrays for high-throughput screening of antibody-antigen interactions*. Nat Biotechnol, 2000. **18**(9): p. 989-94.
52. Rondot, S., et al., *A helper phage to improve single-chain antibody presentation in phage display*. Nat Biotechnol, 2001. **19**(1): p. 75-8.
53. Soltés, G., et al., *On the influence of vector design on antibody phage display*. J Biotechnol, 2007. **127**(4): p. 626-37.
54. Kay, K., J. Winter, and J. McCafferty, *Phage Display of Peptides and Proteins - A Laboratory Manual*. 1 ed. 1996: Academic Press.
55. Zhou, Y., L. Zhao, and J.D. Marks, *Selection and characterization of cell binding and internalizing phage antibodies*. Arch Biochem Biophys, 2012. **526**(2): p. 107-13.
56. Lipes, B.D., et al., *An entirely cell-based system to generate single-chain antibodies against cell surface receptors*. J Mol Biol, 2008. **379**(2): p. 261-72.
57. Ruan, W., et al., *Identification of clinically significant tumor antigens by selecting phage antibody library on tumor cells in situ using laser capture microdissection*. Mol Cell Proteomics, 2006. **5**(12): p. 2364-73.
58. Tanaka, T., et al., *In situ phage screening. A method for identification of subnanogram tissue components in situ*. J Biol Chem, 2002. **277**(33): p. 30382-7.
59. Lu, H., D. Jin, and Y.L. Kapila, *Application of laser capture microdissection to phage display peptide library screening*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2004. **98**(6): p. 692-7.
60. Sorensen, M.D., et al., *Microselection--affinity selecting antibodies against a single rare cell in a heterogeneous population*. J Cell Mol Med, 2010. **14**(7): p. 1953-61.
61. Kubo, N., et al., *Identification of oligopeptide binding to colon cancer cells separated from patients using laser capture microdissection*. J Drug Target, 2008. **16**(5): p. 396-404.
62. Sun, Y., et al., *Biopanning Phage-Display Libraries on Small Tissue Sections Captured by Laser Capture Microdissection*. J Biotech Res, 2009. **1**: p. 55-63.
63. Jarutat, T., et al., *Selection of vimentin-specific antibodies from the HuCAL phage display library by subtractive panning on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue*. Biol Chem, 2007. **388**(6): p. 651-8.
64. Sorensen, M.D. and P. Kristensen, *Selection of antibodies against a single rare cell present in a heterogeneous population using phage display*. Nat Protoc, 2011. **6**(4): p. 509-22.
65. Sievers, E.L. and P.D. Senter, *Antibody-drug conjugates in cancer therapy*. Annu Rev Med, 2013. **64**: p. 15-29.
66. Flygare, J.A., T.H. Pillow, and P. Aristoff, *Antibody-drug conjugates for the treatment of cancer*. Chem Biol Drug Des, 2013. **81**(1): p. 113-21.
67. Gerber, H.P., F.E. Koehn, and R.T. Abraham, *The antibody-drug conjugate: an enabling modality for natural product-based cancer therapeutics*. Nat Prod Rep, 2013. **30**(5): p. 625-39.
68. Kitson, S.L., et al., *Radionuclide antibody-conjugates, a targeted therapy towards cancer*. Curr Radiopharm, 2013. **6**(2): p. 57-71.
69. Jackson, M.R., N. Falzone, and K.A. Vallis, *Advances in anticancer radiopharmaceuticals*. Clin Oncol (R Coll Radiol), 2013. **25**(10): p. 604-9.
70. Steiner, M. and D. Neri, *Antibody-radionuclide conjugates for cancer therapy: historical considerations and new trends*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(20): p. 6406-16.
71. GlaxoSmithKline. *GSK to discontinue manufacture and sale of the BEXXAR® therapeutic regimen*. 2013; Available from: <http://us.gsk.com/en-us/media/press-releases/2013/gsk-to-discontinue-manufacture-and-sale-of-the-bexxar-therapeutic-regimen-tositumomab-and-iodine-i-131-tositumomab/>.
72. Beck, A., *Review of Antibody-Drug Conjugates, Methods in Molecular Biology series: A book edited by Laurent Ducry*. MAbs, 2014. **6**(1): p. 30-3.
73. European-Medicines-Agency. *Questions and answers on recommendation for the refusal of the marketing authorisation for Maylotarg*. 2008; Available from:

- http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Summary_of_opinion_-_Initial_authorisation/human/000705/WC500070678.pdf.
74. Dosio, F., et al., *Advances in anticancer antibody-drug conjugates and immunotoxins*. Recent Pat Anticancer Drug Discov, 2014. **9**(1): p. 35-65.
 75. Sapra, P. and B. Shor, *Monoclonal antibody-based therapies in cancer: advances and challenges*. Pharmacol Ther, 2013. **138**(3): p. 452-69.
 76. Antignani, A. and D. Fitzgerald, *Immunotoxins: the role of the toxin*. Toxins (Basel), 2013. **5**(8): p. 1486-502.
 77. Onda, M., et al., *Recombinant immunotoxin against B-cell malignancies with no immunogenicity in mice by removal of B-cell epitopes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(14): p. 5742-7.
 78. Liu, W., et al., *Recombinant immunotoxin engineered for low immunogenicity and antigenicity by identifying and silencing human B-cell epitopes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(29): p. 11782-7.
 79. Mazor, R., et al., *Recombinant immunotoxin for cancer treatment with low immunogenicity by identification and silencing of human T-cell epitopes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(23): p. 8571-6.
 80. Lorberboum-Galski, H., *Human toxin-based recombinant immunotoxins/chimeric proteins as a drug delivery system for targeted treatment of human diseases*. Expert Opin Drug Deliv, 2011. **8**(5): p. 605-21.
 81. Wang, F., et al., *Selective cytotoxicity to HER2-positive tumor cells by a recombinant e23sFv-TD-tBID protein containing a furin cleavage sequence*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(8): p. 2284-94.
 82. Zhang, D.X., et al., *Potent inhibition of human gastric cancer by HER2-directed induction of apoptosis with anti-HER2 antibody and caspase-3 fusion protein*. Gut, 2010. **59**(3): p. 292-9.
 83. Wang, L.F., et al., *A caspase-6 and anti-HER2 antibody chimeric tumor-targeted proapoptotic molecule decreased metastasis of human osteosarcoma*. Cancer Invest, 2009. **27**(7): p. 774-80.
 84. Stahnke, B., et al., *Granzyme B-H22(scFv), a human immunotoxin targeting CD64 in acute myeloid leukemia of monocytic subtypes*. Mol Cancer Ther, 2008. **7**(9): p. 2924-32.
 85. Schiffer, S., et al., *Granzyme M as a novel effector molecule for human cytolytic fusion proteins: CD64-specific cytotoxicity of Gm-H22(scFv) against leukemic cells*. Cancer Lett, 2013. **341**(2): p. 178-85.
 86. Ben-Yehudah, A., et al., *Using apoptosis for targeted cancer therapy by a new gonadotropin releasing hormone-DNA fragmentation factor 40 chimeric protein*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(3): p. 1179-90.
 87. Mahmud, H., B. Dalen, and W.S. Wels, *Induction of programmed cell death in ErbB2/HER2-expressing cancer cells by targeted delivery of apoptosis-inducing factor*. Mol Cancer Ther, 2009. **8**(6): p. 1526-35.
 88. Bremer, E., et al., *CD7-restricted activation of Fas-mediated apoptosis: a novel therapeutic approach for acute T-cell leukemia*. Blood, 2006. **107**(7): p. 2863-70.
 89. Hetzel, C., et al., *Small cleavable adapters enhance the specific cytotoxicity of a humanized immunotoxin directed against CD64-positive cells*. J Immunother, 2008. **31**(4): p. 370-6.
 90. Tur, M.K., et al., *Targeted restoration of down-regulated DAPK2 tumor suppressor activity induces apoptosis in Hodgkin lymphoma cells*. J Immunother, 2009. **32**(5): p. 431-41.
 91. Robert-Koch-Institut, *Krebs in Deutschland 2009/2010*. 2013. **9. Ausgabe**.
 92. Tiemann, M., C. Hallas, and M. Falk, *Molekularpathologie des Lungenkarzinoms*. Trillium Krebsmedizin, 2014. **Band 23**(Heft 1).
 93. Goeckenjan, G., et al., *[Prevention, diagnosis, therapy, and follow-up of lung cancer]*. Pneumologie, 2010. **64 Suppl 2**: p. e1-164.
 94. Teicher, B.A., *Targets in small cell lung cancer*. Biochem Pharmacol, 2014. **87**(2): p. 211-9.
 95. Kallianos, A., et al., *Therapeutic procedure in small cell lung cancer*. J Thorac Dis, 2013. **5 Suppl 4**: p. S420-4.

96. Grundmann, E., *Allgemeine Pathologie u. Grundlagen der speziellen Pathologie*, ed. Auflage. 2008, München: Elsevier. 560.
97. Pillai, R.N. and T.K. Owonikoko, *Small cell lung cancer: therapies and targets*. Semin Oncol, 2014. **41**(1): p. 133-42.
98. Johnson, B.E., et al., *Phase II study of imatinib in patients with small cell lung cancer*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(16 Pt 1): p. 5880-7.
99. Krug, L.M., et al., *Imatinib mesylate lacks activity in small cell lung carcinoma expressing c-kit protein: a phase II clinical trial*. Cancer, 2005. **103**(10): p. 2128-31.
100. Dy, G.K., et al., *A phase II trial of imatinib (ST1571) in patients with c-kit expressing relapsed small-cell lung cancer: a CALGB and NCCTG study*. Ann Oncol, 2005. **16**(11): p. 1811-6.
101. Arnold, A.M., et al., *Phase II study of vandetanib or placebo in small-cell lung cancer patients after complete or partial response to induction chemotherapy with or without radiation therapy: National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study BR.20*. J Clin Oncol, 2007. **25**(27): p. 4278-84.
102. Spigel, D.R., et al., *Randomized phase II study of bevacizumab in combination with chemotherapy in previously untreated extensive-stage small-cell lung cancer: results from the SALUTE trial*. J Clin Oncol, 2011. **29**(16): p. 2215-22.
103. Sandler, A., *Bevacizumab in non small cell lung cancer*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(15 Pt 2): p. s4613-6.
104. Lee, S.M., et al., *Anti-angiogenic therapy using thalidomide combined with chemotherapy in small cell lung cancer: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial*. J Natl Cancer Inst, 2009. **101**(15): p. 1049-57.
105. Ramalingam, S.S., et al., *Phase II study of Cediranib (AZD 2171), an inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor, for second-line therapy of small cell lung cancer (National Cancer Institute #7097)*. J Thorac Oncol, 2010. **5**(8): p. 1279-84.
106. Piazza, T., et al., *Internalization and recycling of ALCAM/CD166 detected by a fully human single-chain recombinant antibody*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 7): p. 1515-25.
107. ImmunoGen, I., *ImmunoGen, Inc. Announces Discontinuation of IMGN901 Study in Small-Cell Lung Cancer (SCLC)*. 2013.
108. Patel, J.D., et al., *Targeting lethal minimal residual disease in small cell lung cancer*. Semin Oncol, 2003. **30**(1): p. 79-85.
109. Tam, Y.K., et al., *Characterization of genetically altered, interleukin 2-independent natural killer cell lines suitable for adoptive cellular immunotherapy*. Hum Gene Ther, 1999. **10**(8): p. 1359-73.
110. Tur, M.K., et al., *A novel approach for immunization, screening and characterization of selected scFv libraries using membrane fractions of tumor cells*. Int J Mol Med, 2003. **11**(4): p. 523-7.
111. Mühlhardt, C., *Der Experimentator - Molekularbiologie/Genomics*. Vol. 6. 2009, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag. 316.
112. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
113. Birnboim, H.C. and J. Doly, *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. Nucleic Acids Res, 1979. **7**(6): p. 1513-23.
114. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and Maniatis, *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, ed. n. ed. 1989: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
115. Barth, S., et al., *Compatible-solute-supported periplasmic expression of functional recombinant proteins under stress conditions*. Appl Environ Microbiol, 2000. **66**(4): p. 1572-9.
116. Khow, O. and S. Suntrarachun, *Strategies for production of active eukaryotic proteins in bacterial expression system*. Asian Pac J Trop Biomed, 2012. **2**(2): p. 159-62.
117. Block, H., et al., *Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): a review*. Methods Enzymol, 2009. **463**: p. 439-73.
118. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.

119. Meyer, T.S. and B.L. Lamberts, *Use of coomassie brilliant blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips*. *Biochim Biophys Acta*, 1965. **107**(1): p. 144-5.
120. Salinovich, O. and R.C. Montelaro, *Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*. *Anal Biochem*, 1986. **156**(2): p. 341-7.
121. Smith, P.K., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. *Anal Biochem*, 1985. **150**(1): p. 76-85.
122. Fitting, J., et al., *Phage display-based generation of novel internalizing antibody fragments for immunotoxin-based treatment of acute myeloid leukemia*. *MAbs*, 2015. **7**(2): p. 390-402.
123. Niesen, J., et al., *In vitro effects and ex vivo binding of an EGFR-specific immunotoxin on rhabdomyosarcoma cells*. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2014.
124. Kim, T.Y., et al., *Identification of a cell surface 30 kDa protein as a candidate receptor for Hantaan virus*. *J Gen Virol*, 2002. **83**(Pt 4): p. 767-73.
125. Fitzgerald, D. and I. Pastan, *Pseudomonas exotoxin and recombinant immunotoxins derived from it*. *Ann N Y Acad Sci*, 1993. **685**: p. 740-5.
126. Galloway, D.R., R.C. Hedstrom, and O.R. Pavlovskis, *Production and characterization of monoclonal antibodies to exotoxin A from Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*, 1984. **44**(2): p. 262-7.
127. Roehm, N.W., et al., *An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT*. *J Immunol Methods*, 1991. **142**(2): p. 257-65.
128. Ribbert, T., et al., *Recombinant, ETA'-based CD64 immunotoxins: improved efficacy by increased valency, both in vitro and in vivo in a chronic cutaneous inflammation model in human CD64 transgenic mice*. *Br J Dermatol*, 2010. **163**(2): p. 279-86.
129. van Engeland, M., et al., *Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure*. *Cytometry*, 1998. **31**(1): p. 1-9.
130. Hammers, C.M. and J.R. Stanley, *Antibody phage display: technique and applications*. *J Invest Dermatol*, 2014. **134**(2): p. e17.
131. Ye, J., et al., *IgBLAST: an immunoglobulin variable domain sequence analysis tool*. *Nucleic Acids Res*, 2013. **41**(Web Server issue): p. W34-40.
132. Thie, H., et al., *Rise and fall of an anti-MUC1 specific antibody*. *PLoS One*, 2011. **6**(1): p. e15921.
133. Girgis, M.D., et al., *Targeting CEA in Pancreas Cancer Xenografts with a Mutated scFv-Fc Antibody Fragment*. *EJNMMI Res*, 2011. **1**(1): p. 24.
134. Moutel, S., et al., *A multi-Fc-species system for recombinant antibody production*. *BMC Biotechnol*, 2009. **9**: p. 14.
135. Schirrmann, T. and G. Pecher, *Specific targeting of CD33(+) leukemia cells by a natural killer cell line modified with a chimeric receptor*. *Leuk Res*, 2005. **29**(3): p. 301-6.
136. Cizeau, J., et al., *Engineering and biological characterization of VB6-845, an anti-EpCAM immunotoxin containing a T-cell epitope-depleted variant of the plant toxin bouganin*. *J Immunother*, 2009. **32**(6): p. 574-84.
137. Brehm, H., et al., *A CSPG4-specific immunotoxin kills rhabdomyosarcoma cells and binds to primary tumor tissues*. *Cancer Lett*, 2014. **352**(2): p. 228-35.
138. Ramos-Vara, J.A., *Technical aspects of immunohistochemistry*. *Vet Pathol*, 2005. **42**(4): p. 405-26.
139. Bussolati, G. and E. Leonardo, *Technical pitfalls potentially affecting diagnoses in immunohistochemistry*. *J Clin Pathol*, 2008. **61**(11): p. 1184-92.
140. Bird, R.E. and B.W. Walker, *Single chain antibody variable regions*. *Trends Biotechnol*, 1991. **9**(4): p. 132-7.
141. Hust, M., et al., *Single chain Fab (scFab) fragment*. *BMC Biotechnol*, 2007. **7**: p. 14.
142. Kramer, K., et al., *A generic strategy for subcloning antibody variable regions from the scFv phage display vector pCANTAB 5 E into pASK85 permits the economical production of F(ab)*

- fragments and leads to improved recombinant immunoglobulin stability.* Biosens Bioelectron, 2002. **17**(4): p. 305-13.
143. Fairley, J.A., K. Gilmour, and K. Walsh, *Making the most of pathological specimens: molecular diagnosis in formalin-fixed, paraffin embedded tissue.* Curr Drug Targets, 2012. **13**(12): p. 1475-87.
144. Arap, W., et al., *Steps toward mapping the human vasculature by phage display.* Nat Med, 2002. **8**(2): p. 121-7.
145. Lou, J.J., et al., *A review of room temperature storage of biospecimen tissue and nucleic acids for anatomic pathology laboratories and biorepositories.* Clin Biochem, 2014. **47**(4-5): p. 267-73.
146. Thavarajah, R., et al., *Chemical and physical basics of routine formaldehyde fixation.* J Oral Maxillofac Pathol, 2012. **16**(3): p. 400-5.
147. Huang, S.N., *Immunohistochemical demonstration of hepatitis B core and surface antigens in paraffin sections.* Lab Invest, 1975. **33**(1): p. 88-95.
148. Huang, S.N., H. Minassian, and J.D. More, *Application of immunofluorescent staining on paraffin sections improved by trypsin digestion.* Lab Invest, 1976. **35**(4): p. 383-90.
149. Shi, S.R., M.E. Key, and K.L. Kalra, *Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections.* J Histochem Cytochem, 1991. **39**(6): p. 741-8.
150. Shi, S.R., et al., *Antigen retrieval technique utilizing citrate buffer or urea solution for immunohistochemical demonstration of androgen receptor in formalin-fixed paraffin sections.* J Histochem Cytochem, 1993. **41**(11): p. 1599-604.
151. Yamashita, S., *Heat-induced antigen retrieval: mechanisms and application to histochemistry.* Prog Histochem Cytochem, 2007. **41**(3): p. 141-200.
152. Syrbu, S.I. and M.B. Cohen, *An enhanced antigen-retrieval protocol for immunohistochemical staining of formalin-fixed, paraffin-embedded tissues.* Methods Mol Biol, 2011. **717**: p. 101-10.
153. Kajiya, H., et al., *Selection of buffer pH by the isoelectric point of the antigen for the efficient heat-induced epitope retrieval: re-appraisal for nuclear protein pathobiology.* Histochem Cell Biol, 2009. **132**(6): p. 659-67.
154. Garet, E., et al., *Rapid isolation of single-chain antibodies by phage display technology directed against one of the most potent marine toxins: Palytoxin.* Toxicon, 2010. **55**(8): p. 1519-26.
155. Wang, Y., et al., *Isolation of single chain variable fragment (scFv) specific for Cry1C toxin from human single fold scFv libraries.* Toxicon, 2012. **60**(7): p. 1290-7.
156. Abdolalizadeh, J., et al., *Targeting cytokines: production and characterization of anti-TNF- α scFvs by phage display technology.* Curr Pharm Des, 2013. **19**(15): p. 2839-47.
157. Eteshola, E., *Isolation of scFv fragments specific for monokine induced by interferon-gamma (MIG) using phage display.* J Immunol Methods, 2010. **358**(1-2): p. 104-10.
158. Wu, S., A. Ke, and J.A. Doudna, *A fast and efficient procedure to produce scFvs specific for large macromolecular complexes.* J Immunol Methods, 2007. **318**(1-2): p. 95-101.
159. Pokorny, N.J., et al., *Inhibition of Cryptosporidium parvum infection of a mammalian cell culture by recombinant scFv antibodies.* Antonie Van Leeuwenhoek, 2008. **94**(3): p. 353-64.
160. Marcus, W.D., et al., *Isolation of an scFv targeting BRG1 using phage display with characterization by AFM.* Biochem Biophys Res Commun, 2006. **342**(4): p. 1123-9.
161. Boulter-Bitzer, J.I., H. Lee, and J.T. Trevors, *Single-chain variable fragment antibodies selected by phage display against the sporozoite surface antigen P23 Of Cryptosporidium parvum.* J Parasitol, 2009. **95**(1): p. 75-81.
162. Yan, J.P., J.H. Ko, and Y.P. Qi, *Generation and characterization of a novel single-chain antibody fragment specific against human fibrin clots from phage display antibody library.* Thromb Res, 2004. **114**(3): p. 205-11.

163. Marcus, W.D., S.M. Lindsay, and M.R. Sierks, *Identification and repair of positive binding antibodies containing randomly generated amber codons from synthetic phage display libraries*. Biotechnol Prog, 2006. **22**(3): p. 919-22.
164. Nissim, A., et al., *Antibody fragments from a 'single pot' phage display library as immunochemical reagents*. EMBO J, 1994. **13**(3): p. 692-8.
165. Linnoila, R.I., et al., *Neuroendocrine differentiation in endocrine and nonendocrine lung carcinomas*. Am J Clin Pathol, 1988. **90**(6): p. 641-52.
166. Rusch, V.W., D.S. Klimstra, and E.S. Venkatraman, *Molecular markers help characterize neuroendocrine lung tumors*. Ann Thorac Surg, 1996. **62**(3): p. 798-809; discussion 809-10.
167. Capella, C., et al., *Revised classification of neuroendocrine tumours of the lung, pancreas and gut*. Virchows Arch, 1995. **425**(6): p. 547-60.
168. Lamberts, S.W., L.J. Hofland, and F.R. Nobels, *Neuroendocrine tumor markers*. Front Neuroendocrinol, 2001. **22**(4): p. 309-39.
169. Matsumoto, Y., *Simultaneous inhibition of endogenous avidin-binding activity and peroxidase applicable for the avidin-biotin system using monoclonal antibodies*. Histochemistry, 1985. **83**(4): p. 325-30.
170. Wood, G.S. and R. Warnke, *Suppression of endogenous avidin-binding activity in tissues and its relevance to biotin-avidin detection systems*. J Histochem Cytochem, 1981. **29**(10): p. 1196-204.
171. Bussolati, G., et al., *Retrieved endogenous biotin: a novel marker and a potential pitfall in diagnostic immunohistochemistry*. Histopathology, 1997. **31**(5): p. 400-7.
172. Travis, W.D., et al., *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*. 2004, Lyon: International Agency for Research on Cancer Press.
173. Capelozzi, V.L., *Role of immunohistochemistry in the diagnosis of lung cancer*. J Bras Pneumol, 2009. **35**(4): p. 375-82.
174. Bolanos-Garcia, V.M. and O.R. Davies, *Structural analysis and classification of native proteins from E. coli commonly co-purified by immobilised metal affinity chromatography*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1760**(9): p. 1304-13.
175. Zhang, Y. and I. Pastan, *High shed antigen levels within tumors: an additional barrier to immunoconjugate therapy*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(24): p. 7981-6.
176. Weidle, U.H., et al., *Prospects of bacterial and plant protein-based immunotoxins for treatment of cancer*. Cancer Genomics Proteomics, 2014. **11**(1): p. 25-38.
177. Weldon, J.E., et al., *A protease-resistant immunotoxin against CD22 with greatly increased activity against CLL and diminished animal toxicity*. Blood, 2009. **113**(16): p. 3792-800.
178. Tur, M.K., et al., *An anti-GD2 single chain Fv selected by phage display and fused to Pseudomonas exotoxin A develops specific cytotoxic activity against neuroblastoma derived cell lines*. Int J Mol Med, 2001. **8**(5): p. 579-84.
179. Gattenlohner, S., et al., *A human recombinant autoantibody-based immunotoxin specific for the fetal acetylcholine receptor inhibits rhabdomyosarcoma growth in vitro and in a murine transplantation model*. J Biomed Biotechnol, 2010. **2010**: p. 187621.
180. Klimka, A., et al., *An anti-CD30 single-chain Fv selected by phage display and fused to Pseudomonas exotoxin A (Ki-4(scFv)-ETA') is a potent immunotoxin against a Hodgkin-derived cell line*. Br J Cancer, 1999. **80**(8): p. 1214-22.
181. Kawa, S., et al., *The improvement of an anti-CD22 immunotoxin: conversion to single-chain and disulfide stabilized form and affinity maturation by alanine scan*. MAbs, 2011. **3**(5): p. 479-86.
182. Kuan, C.T., et al., *Affinity-matured anti-glycoprotein NMB recombinant immunotoxins targeting malignant gliomas and melanomas*. Int J Cancer, 2011. **129**(1): p. 111-21.
183. Piao, H., et al., *Affinity-matured recombinant immunotoxin targeting gangliosides 3'-isoLM1 and 3',6'-isoLD1 on malignant gliomas*. MAbs, 2013. **5**(5): p. 748-62.
184. Seetharam, S., et al., *Increased cytotoxic activity of Pseudomonas exotoxin and two chimeric toxins ending in KDEL*. J Biol Chem, 1991. **266**(26): p. 17376-81.

185. Kreitman, R.J. and I. Pastan, *Importance of the glutamate residue of KDEL in increasing the cytotoxicity of Pseudomonas exotoxin derivatives and for increased binding to the KDEL receptor*. Biochem J, 1995. **307 (Pt 1)**: p. 29-37.
186. Smith, D.C., et al., *Internalized Pseudomonas exotoxin A can exploit multiple pathways to reach the endoplasmic reticulum*. Traffic, 2006. **7(4)**: p. 379-93.
187. Mere, J., et al., *Acid-triggered membrane insertion of Pseudomonas exotoxin A involves an original mechanism based on pH-regulated tryptophan exposure*. J Biol Chem, 2005. **280(22)**: p. 21194-201.
188. Zhu, X., et al., *A new recombinant immunotoxin hscFv-ETA' demonstrates specific cytotoxicity against chronic myeloid leukemia cells in vitro*. Immunol Lett, 2013. **154(1-2)**: p. 18-24.
189. Tur, M.K., et al., *In vivo efficacy of the recombinant anti-CD64 immunotoxin H22(scFv)-ETA' in a human acute myeloid leukemia xenograft tumor model*. Int J Cancer, 2011. **129(5)**: p. 1277-82.
190. Tur, M.K., et al., *Recombinant CD64-specific single chain immunotoxin exhibits specific cytotoxicity against acute myeloid leukemia cells*. Cancer Res, 2003. **63(23)**: p. 8414-9.
191. Hristodorov, D., et al., *Human microtubule-associated protein tau mediates targeted killing of CD30(+) lymphoma cells in vitro and inhibits tumour growth in vivo*. Br J Haematol, 2014. **164(2)**: p. 251-7.
192. Tur, M.K., et al., *Immunokinases, a novel class of immunotherapeutics for targeted cancer therapy*. Curr Pharm Des, 2009. **15(23)**: p. 2693-9.
193. Schirrmann, T., et al., *Targeted therapeutic RNases (ImmunoRNases)*. Expert Opin Biol Ther, 2009. **9(1)**: p. 79-95.
194. Krutzik, P.O. and G.P. Nolan, *Intracellular phospho-protein staining techniques for flow cytometry: monitoring single cell signaling events*. Cytometry A, 2003. **55(2)**: p. 61-70.
195. O'Farrell, P.H., *High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins*. J Biol Chem, 1975. **250(10)**: p. 4007-21.
196. Friedman, D.B., S. Hoving, and R. Westermeier, *Isoelectric focusing and two-dimensional gel electrophoresis*. Methods Enzymol, 2009. **463**: p. 515-40.
197. Wilkins, M.R., et al., *Two-dimensional gel electrophoresis for proteome projects: the effects of protein hydrophobicity and copy number*. Electrophoresis, 1998. **19(8-9)**: p. 1501-5.
198. Lescuyer, P., et al., *Progress in the definition of a reference human mitochondrial proteome*. Proteomics, 2003. **3(2)**: p. 157-67.
199. Hansen, M.H., H. Nielsen, and H.J. Ditzel, *The tumor-infiltrating B cell response in medullary breast cancer is oligoclonal and directed against the autoantigen actin exposed on the surface of apoptotic cancer cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98(22)**: p. 12659-64.
200. Riedel, S.S., et al., *Non-invasive imaging provides spatiotemporal information on disease progression and response to therapy in a murine model of multiple myeloma*. PLoS One, 2012. **7(12)**: p. e52398.
201. Thalheimer, A., et al., *Noninvasive visualization of tumor growth in a human colorectal liver metastases xenograft model using bioluminescence in vivo imaging*. J Surg Res, 2013. **185(1)**: p. 143-51.

Abkürzungsverzeichnis

7AAD	7-Aminoactinomycin D
Abb.	Abbildung
ADC	Antikörper-Wirkstoff-Konjugat („ <i>antibody-drug conjugate</i> “)
ADCC	Antikörperabhängige-Zellzytotoxizität („ <i>antibody dependent cell cytotoxicity</i> “)
ALCL	Anaplastisches großzelliges Lymphom („ <i>anaplastic large cell lymphoma</i> “)
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
BCA	Bicinchoninsäure („ <i>bicinchoninic acid</i> “)
BLI	Biolumineszenz Imaging
bp	Basenpaar
BZR	B-Zellrezeptor
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CDR	„ <i>Complementarity Determining Region</i> “
cfu	koloniebildende Einheit („ <i>colony forming unit</i> “)
CML	chronisch myeloische Leukämie
CTCL	Kutanes T-Zell Lymphom („ <i>cutan t cell lymphoma</i> “)
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure („ <i>deoxyribonucleic acid</i> “)
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsFv	„ <i>disulfide-stabilized fragment variable</i> “
EABA	endogene Avidin-Biotin Aktivität
EBV	Epstein-Barr Virus
ECL	„ <i>Enhanced Chemiluminescence</i> “
ED	„ <i>extensive disease</i> “
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Fab	antigenbindendes Fragment („ <i>Fragment antigen binding</i> “)
FACS	fluoreszenzaktivierter Zellsortierer („ <i>fluorescence activated cell sorter</i> “)
Fc	„ <i>Fragment crystallizable</i> “
FITC	Fluoresceinisothiocyanat

FKS	Fötales Kälberserum
FWR	Framework Region
gam	Ziege anti-Maus („ <i>goat anti-mouse</i> “)
h	Stunde
HAMA	Humane-Anti-Maus-Antikörper
HIER	hitzeinduzierte Epitopfreilegung („ <i>heat induced epitope retrieval</i> “)
HPV	Humanes Papillomavirus
IEX	Ionenaustauschchromatographie („ <i>ion-exchange chromatography</i> “)
IHC	Immunhistochemie
IgA	Immunglobulin Alpha
IgD	Immunglobulin Delta
IgE	Immunglobulin Epsilon
IgG	Immunglobulin Gamma
IgM	Immunglobulin My
IL-2	Interleukin 2
IMAC	immobilisierte Metallchelate-Affinitäts-Chromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IT	Immuntoxin
IUPAC	„ <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> “
kb	Kilobasen
kDa	Kilo Dalton
LCM	Laser Capture Mikrodisektion
LD	„ <i>limited disease</i> “
M	Molar
mAK	monoklonaler Antikörper
MEM α	„ <i>Modified Eagle Medium alpha</i> “
MF	Membranfragment
min.	Minute
μ g	Mikrogramm
mg	Milligramm
μ l	Mikroliter
ml	Milliliter
μ m	Mikrometer
μ M	Mikromolar
mM	Millimolar

MMAE	Monomethylaurisatin E
MPBS	Milchpulver in Phosphat gepufferter Saline
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NSCLC	nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom („ <i>non small cell lung cancer</i> “)
OD	optische Dichte
pAK	polyklonaler Antikörper
PBMC	Periphere mononukleare Blutzelle („ <i>peripheral blood mononuclear cell</i> “)
PBS	Phosphat gepufferte Saline („ <i>phosphate buffered saline</i> “)
PCI	prophylaktische Bestrahlung des Schädels („ <i>prophylactic cranial irradiation</i> “)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion („ <i>polymerase chain reaction</i> “)
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PIER	proteolytisch-induzierte Epitopfreilegung („ <i>proteolytic induced epitope retrieval</i> “)
PMS	Phenazinmethosulfat
PS	Phosphatidylserin
P/S	Penicillin/Streptomycin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rpm	Umdrehungen pro Minute („ <i>rounds per minute</i> “)
RPMI	„ <i>Roswell Park Memorial Institute</i> “
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SA	Streptavidin
scFv	Einzelkettenantikörper („ <i>single chain variable fragment</i> “)
SCLC	kleinzelliges Bronchialkarzinom („ <i>small cell lung cancer</i> “)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sec.	Sekunde
SEC	Größenausschlusschromatographie („ <i>size exclusion chromatography</i> “)
SOC Medium	„ <i>Super optimal Broth catabolite repression Medium</i> “
ssDNA	Einzelstrang DNA („ <i>single stranded DNA</i> “)
TAA	tumorassoziiertes Antigen
TB Medium	„ <i>Terrific Broth Medium</i> “

TMA	„ <i>Tissue Microarray</i> “
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
V	Volt
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
V _H	variable schwere Kette („ <i>variable heavy chain</i> “)
V _L	variable leichte Kette („ <i>variable light chain</i> “)
VLD	„ <i>very limited disease</i> “
WP	Waschpuffer
w/v	Gewicht pro Volumen („ <i>weight/volume</i> “)
XTT	2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilid

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung eines IgG Antikörpers	2
Abb. 2: Genom eines Ff Bakteriophagen und Aufbau des Phagenpartikels	7
Abb. 3: Schematische Darstellung verschiedener Antikörperformate.....	10
Abb. 4: Schematische Darstellung einer Standard-Antikörperselektion mittels Phage Display	12
Abb. 5: Expressionskassette des Phagemids pIT2	32
Abb. 6: Expressionskassette des eukaryotischen Expressionsvektors pMS2.....	32
Abb. 7: Expressionskassette des Fab-Vektors pGAL.....	33
Abb. 8: Expressionskassette des prokaryotischen Expressionsvektors pMT2	33
Abb. 9: Expressionskassette des rekombinanten Immuntoxin-Vektors pMT-ETA'.....	34
Abb. 10: Schematische Darstellung der <i>On Slide</i> Selektion	53
Abb. 11: Übersicht der Tissue Micro Arrays.....	62
Abb. 12: PCR-Nachweis von scFv-Antikörpergenen der Antikörperbibliotheken Tomlinson I und J....	67
Abb. 13: Anreicherung SCLC-spezifischer Antikörper nach Selektion auf Patientenmaterial 1.....	69
Abb. 14: Anreicherung SCLC-spezifischer Antikörper nach Selektion auf Patientenmaterial 2, 3 und 4	70
Abb. 15: SCLC-spezifischer Bindungsnachweis von 12 ausgewählten Klonen auf Phagenebene	72
Abb. 16: Transfektionsnachweis von HEK 293T Zellen zur Produktion von Fc-Fusionsproteinen	74
Abb. 17: Nachweis der scFv-Fc Fusionsproteine mittels Coomassie-Färbung und Western Blot.....	75
Abb. 18: SCLC-spezifische Bindeaktivität der scFv-Fc Fusionsproteine im ELISA.....	76
Abb. 19: SCLC-spezifische Bindeaktivität der scFv-Fc Fusionsproteine im Durchflusszytometer	78
Abb. 20: Internalisierungsverhalten der scFv-Fc's 3B, 3E und 6E im Durchflusszytometer.....	80
Abb. 21: Internalisierungsverhalten der scFv-Fc's 3B, 3E und 6E im Konfokalmikroskop	81
Abb. 22: Nachweis der Fab-Fragmente mittels Coomassie-Färbung und Western Blot.....	82
Abb. 23: SCLC-spezifische Bindeaktivität der Fab-Fragmente im Durchflusszytometer.....	84
Abb. 24: Abnahme der Zell-Bindeaktivität der Fab-Fragmente nach Trypsinbehandlung.....	85
Abb. 25: Immunhistochemische Verifizierung der SCLC-spezifischen Fab-Bindeaktivität.....	87
Abb. 26: Nachweis der ETA'-Konstrukte mittels Coomassie-Färbung und Western Blot	89
Abb. 27: SCLC-spezifische Bindung der rekombinanten Immuntoxine im Durchflusszytometer	90
Abb. 28: Proliferationshemmende Wirkung der Immuntoxine	91
Abb. 29: Zytotoxischer Effekt der rekombinanten Immuntoxine	93

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Anzahl an V, D und J Gensegmenten	3
Tabelle 2: Anwendungen monoklonaler Antikörper in der Diagnose und Therapie	4
Tabelle 3: TNM-Klassifikation beim kleinzelligen Bronchialkarzinom.....	20
Tabelle 4: Stadieneinteilung des Lungenkarzinoms	21
Tabelle 5: PCR-Ansatz und Programm.....	41
Tabelle 6: Sequenzierungs-PCR	42
Tabelle 7: Übersicht der Restriktionsverdau	43
Tabelle 8: Waschprotokoll der <i>On Slide</i> Selektion	52
Tabelle 9: PCR-Ansatz und -Programm der ortsgerechten Mutagenese	56
Tabelle 10: Verwendete Zellzahl für den XTT-Assay	64
Tabelle 11: Anreicherungsfaktoren der Selektionen auf verschiedenen SCLC Patientenbiopsaten.....	68
Tabelle 12: Aminosäuresequenzen der CDR 2 und 3 von 12 selektierten scFv-Klonen.....	71
Tabelle 13: Mittlere inhibitorische Dosis (IC_{50}) der Immuntoxine	92
Tabelle 14: Übersicht der Charakterisierung der selektierten Antikörper.....	94

Eigene Veröffentlichungen

- **Ten Haaf A**, Pscherer S, Fries K, Barth S, Gattenlohner S, Tur MK: Phage display-based on-slide selection of tumor-specific antibodies on formalin-fixed paraffin-embedded human tissue biopsies. *Immunol Lett* 2015.
- Metzelder SK, Michel C, von Bonin M, Rehberger M, Hessmann E, Inselmann S, Solovey M, Wang Y, Sohlbach K, Brendel C, Stiewe T, Charles J, **Ten Haaf A**, Ellenrieder V, Neubauer A, Gattenlohner S, Bornhauser M and Burchert A: NFATc1 as a therapeutic target in FLT3-ITD-positive AML. *Leukemia* 2015.
- Fitting J, Blume T, **Ten Haaf A**, Blau W, Gattenlohner S, Tur MK, Barth S: Phage display-based generation of novel internalizing antibody fragments for immunotoxin-based treatment of acute myeloid leukemia. *MAbs* 2015, 7(2):390-402.
- Niesen J, Brehm H, Stein C, Berges N, Pardo A, Fischer R, **Ten Haaf A**, Gattenlohner S, Tur MK, Barth S: In vitro effects and ex vivo binding of an EGFR-specific immunotoxin on rhabdomyosarcoma cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 2015, **141**(6):1049-1061.
- **Ten Haaf A**, Fries K, Pscherer S, Gattenlohner S, Tur MK: On slide selection on patient SCLC tissue (FFPE) for generation of specific antibodies. *Der Pathologe* 2014, 35(1 Suppl):81
- Tur MK, **Ten Haaf A**, Braunniger A, Gattenlohner S: CD56 (140kD) up-regulation plays a pivotal role in the pathogenesis of ischemic cardiomyopathy. *Der Pathologe* 2014, 35(1 Suppl):89
- Schirrmann T, Steinwand M, Wezler X, **Ten Haaf A**, Tur MK, Barth S: CD30 as a therapeutic target for lymphoma. *BioDrugs* 2014, 28(2):181-209.
- Tur MK, Etschmann B, Benz A, Leich E, Waller C, Schuh K, Rosenwald A, Ertl G, Kienitz A, **Haaf AT** et al: The 140-kD isoform of CD56 (NCAM1) directs the molecular pathogenesis of ischemic cardiomyopathy. *Am J Pathol* 2013, 182(4):1205-1218.
- Horz HP, **Ten Haaf A**, Kessler O, Said Yekta S, Seyfarth I, Hettlich M, Lampert F, Kupper T, Conrads G: T-RFLP-based differences in oral microbial communities as risk factor for development of oral diseases under stress. *Environ Microbiol Rep* 2012, 4(4):390-397.