

**On-Slide Selektion zur Generierung spezifischer Antikörper  
gegen Akute Myeloische Leukämie  
mit Hilfe der Phage-Display-Technologie**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Rossner, Anna-Maria Jakobine Elisabeth  
aus Worms

Gießen 2017

Aus dem Institut für Pathologie,  
unter der Leitung von Prof. Dr. med. Stefan Gattenlöhner  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. med. Stefan Gattenlöhner

Gutachter: Prof. Dr. med. Mathias Rummel

Tag der Disputation: 14.08.2018

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Akute myeloische Leukämie .....	1
1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie.....	1
1.1.2 Symptome und Diagnostik .....	2
1.1.3 Klassifikation und Prognoseabschätzung.....	5
1.1.4 Therapeutische Konzepte .....	7
1.2 Antikörper.....	10
1.3 Generierung spezifischer Antikörperfragmente mit Hilfe der Phage- Display- Technologie .....	13
1.3.1 Das Prinzip der Phage-Display-Technologie.....	13
1.3.2 Phage-Display-Bibliotheken.....	14
1.3.3 Formate des molekularen Displays .....	16
1.3.4 Ablauf der „panning“-Runden .....	18
1.3.5 Optionen der Präsentation des Selektionsantigens.....	21
1.4 Zielsetzung.....	23
<b>2. Material</b> .....	<b>25</b>
2.1 Geräte und Software.....	25
2.2 Verbrauchsmittel und Reagenzien .....	26
2.3 Puffer und Lösungen .....	28
2.4 Medien.....	30
2.5 Enzyme .....	31
2.6 Antibiotika .....	31
2.7 Antikörper.....	31
2.8 Reaktionskits.....	32
2.9 Bakterienstämme.....	33
2.10 Zelllinien.....	33
2.11 Patientenmaterial.....	34
2.12 Vektoren .....	34
<b>3. Methoden</b> .....	<b>35</b>
3.1 Phage-Display-Methoden .....	35
3.1.1 Herstellung scFv-präsentierender Phagenpartikel .....	35

3.1.2	Spezifische Vorbehandlung der Gewebeschnitte.....	36
3.1.3	Depletion und Selektion der scFv-Fragmente .....	37
3.1.4	Input- und Output-Titer-Bestimmungen der Phagensuspension.....	38
3.2	Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay (ELISA) .....	39
3.2.1	Polyklonaler ELISA .....	39
3.2.2	Monoklonaler ELISA .....	40
3.3	Molekularbiologische Verfahren .....	41
3.3.1	Polymerase-Kettenreaktion.....	41
3.3.2	Agarose-Gelelektrophorese .....	43
3.3.3	Konzentrationsbestimmung von DNA .....	44
3.3.4	Sequenzierung.....	44
3.3.5	Plasmidpräparation.....	45
3.3.6	Hitzeschocktransformation von <i>E. coli</i> Bakterien .....	45
3.3.7	Restriktionsverdau von DNA-Fragmenten.....	46
3.3.8	Ortsgerichtete Mutagenese .....	47
3.3.9	Umklonierung von DNA-Fragmenten.....	47
3.3.10	Western-Blot.....	49
3.4	Zellbiologische Verfahren .....	50
3.4.1	Kultivierung von Zelllinien .....	50
3.4.2	Manuelle Zellzählung.....	51
3.4.3	Kryokonservierung von kultivierten Zellen.....	52
3.4.4	Transfektion der HEK 293T Zellen .....	52
3.4.5	Herstellung von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC's).....	53
3.4.6	Herstellung biologisch intakter Membranfragmente .....	54
3.5	Analyse der Bindungsaktivität der scFv-Fc Fusionsproteine mittels Durchflusszytometrie .....	55
3.6	Analyse der Bindungsaktivität mittels Fab-Antikörperfragmenten .....	55
3.6.1	Herstellung der Fab-Antikörperfragmente .....	55
3.6.2	Durchflusszytometrische Analysen auf vitalen Zelllinien .....	56
3.6.3	Immunhistochemische Analysen .....	57
3.6.4	Immunfluoreszenz-Analysen .....	58
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>60</b>
4.1	Anreicherungsverhalten scFv-präsentierender Phagen der On-Slide-Selektion .....	60

4.2	Analyse des Bindungsverhalten scFv-präsentierender Phagen .....	61
4.2.1	Polyklonaler ELISA .....	61
4.2.2	Monoklonaler ELISA .....	63
4.3	Produktion und Analyse des Bindungsverhaltens löslicher scFv-Fc Fusionsproteine .....	65
4.3.1	Vorbereitungen zur eukaryotischen Genexpression.....	65
4.3.2	Transfektionskontrolle der HEK 293T Zellen.....	66
4.3.3	Überprüfung der Herstellung mittels Western Blots.....	66
4.3.4	Durchflusszytometrische Analysen des Bindungsverhaltens auf Zelllinien .....	67
4.3.5	Durchflusszytometrische Analysen des Bindungsverhaltens auf PBMC's von AML-Patienten.....	70
4.4	Analyse des Bindungsverhaltens von Fab-Antikörperfragmenten .....	71
4.4.1	Überprüfung der Herstellung mittels Western Blot .....	71
4.4.2	Durchflusszytometrische Analysen des Bindungsverhaltens auf Zelllinien .....	72
4.4.3	Immunhistochemische Analysen .....	74
4.4.4	Immunfluoreszenz-Analysen .....	76
<b>5.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>79</b>
5.1	Der Selektionsprozess .....	79
5.1.1	FFPE-Gewebe als Selektionsantigen – Die On-Slide Selektion.....	79
5.1.2	Effizienz der Selektion .....	84
5.1.3	Die Depletion.....	87
5.2	Identifizierung und Charakterisierung der selektionierten Binder.....	90
5.2.1	Initiale Charakterisierung.....	90
5.2.2	Ortsgerichtete Mutagenese .....	92
5.2.3	Bindeaktivitäten der selektionierten Klone in unterschiedlichen Antikörperformaten.....	93
5.2.4	Kreuzreaktivität.....	99
5.3	Ausblick.....	103
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>107</b>
6.1	Summary.....	108
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>		<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>		<b>VI</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>		<b>VII</b>

<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>VIII</b>
<b>Anhang.....</b>	<b>XIX</b>
<b>Ehrenwörtliche Erklärung.....</b>	<b>XX</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>XXI</b>
<b>Lebenslauf.....</b>	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>

## 1. Einleitung

### 1.1 Akute myeloische Leukämie

Leukämien sind maligne Erkrankungen des blutbildenden Systems, bei denen es durch somatische Mutation einer hämatopoetischen Stammzelle zur unkontrollierten Proliferation funktionsloser Vorläuferzellen (Blasten) in der myeloischen oder lymphatischen Reihe kommt (Kumar et al., 2008; Shlush et al., 2014). Erkrankungen des leukämischen Formenkreises können zum einen anhand der Zugehörigkeit der entarteten Zellreihe (myeloisch oder lymphatisch) und zum anderen nach der Aggressivität des Krankheitsverlaufs (akut und chronisch) klassifiziert werden. Demnach ergeben sich vier übergeordnete Krankheitsbilder: Die chronisch lymphatische (CLL), die chronisch myeloische (CML), die akute lymphatische (ALL) und letztendlich die akute myeloische Leukämie (AML).

Nachfolgend soll das Krankheitsbild der akuten myeloischen Leukämie (AML) eingehend dargestellt werden.

#### 1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Die AML lässt sich in die Gruppe der seltenen Erkrankungen einordnen, sie macht weniger als 3 % aller Krebserkrankungen weltweit aus (Deschler und Lübbert, 2006). Ihre Gesamtinzidenz beträgt ca. 3,5 auf 100.000 Einwohner pro Jahr in Deutschland, wobei Männer vermehrt betroffen sind als Frauen (m:w 1,6:1). Mit über 80 % ist die AML die häufigste Form der akuten Leukämien im Erwachsenenalter. Im Kindesalter ist der Anteil mit ca. 20 % geringer, hier repräsentiert die ALL die Mehrheit der akuten Leukämien (Zentrum für Krebsregisterdaten, Stand: 2015). Die Inzidenz der AML steigt mit dem Alter. Während in der Altersgruppe unter 60 Jahre ca. 1,3 Erkrankungen auf 100.000 Einwohner registriert wurden, sind es in der Altersgruppe über 60 Jahre ca. 12,2 Erkrankungen. Das mediane Alter der Diagnosestellung beträgt somit ca. 65 Jahre (Kouchkovsky und Abdul-Hay, 2016).

Unbehandelt stellt die AML eine tödliche Erkrankung dar und selbst unter adäquater Therapie liegt die 5-Jahres-Überlebensrate im gemittelten Altersdurchschnitt nur bei knapp 30 % (Deschler und Lübbert, 2006; Zentrum für Krebsregisterdaten, Stand: 2015). In der Altersgruppe der über 60-jährigen mit intensiver Chemotherapie beträgt sie gerade einmal 15 % (Krug et al., 2011).

Die Ätiologie ist bei der Mehrheit der an AML erkrankten Patienten nicht einfach ersichtlich. Meist geht man von einer multifaktoriellen Genese aus. Im direkten Vergleich sei die CML genannt, deren Genese von monofaktoriellem Charakter ist. Nahezu 100 % aller CML-Erkrankungen sind auf das Fusionsgen BCR-ABL (Philadelphia-Chromosom) zurückzuführen. Bei der AML ist es lediglich in weniger als 1 % der Fälle nachzuweisen (Kumar et al., 2008).

Zu den bekannten prädisponierenden Faktoren der AML können physikalische bzw. chemische Einflüsse, wie Benzol, ionisierende Strahlung oder Nikotinabusus, aber auch genetische Faktoren gezählt werden. Zum Beispiel weisen an Trisomie 21 erkrankte Menschen ein 10 bis 20-fach erhöhtes Risiko kongenital oder im weiteren Lebensverlauf an einer AML zu erkranken auf (Fong und Brodeur, 1987). Weitere hereditäre Erkrankungen mit einem erhöhten Lebenszeitrisko der Erkrankung an AML sind unter anderen das Klinefelter-Syndrom, das Li-Fraumeni-Syndrom oder die Neurofibromatose. Ebenso wird eine Rolle der Retroviren wie z.B. des Parvovirus B19 in der Pathogenese der AML vermutet. Sehr häufig entwickelt sich eine AML aber auch sekundär auf Basis einer bereits existenten hämatologischen Erkrankung, wie z.B. dem Myelodysplastischen Syndrom (MDS) oder aus Erkrankungen des myeloproliferativen Formenkreises. Zahlreich tritt eine AML auch therapieassoziiert nach Behandlung mit diversen Chemotherapeutika auf. Hier spielen Alkylantien, Topoisomerase-II-Inhibitoren (Epidodophyllotoxine), Taxane und Anthrazykline eine Rolle in der Pathogenese (Deschler und Lübbert, 2006).

### 1.1.2 Symptome und Diagnostik

Durch den schnellen und aggressiven Krankheitsverlauf kann es bei der AML zur plötzlichen Entwicklung von Symptomen kommen. Diese können sich sehr unspezifisch und unterschiedlich manifestieren, lassen sich aber alle auf die unkontrollierte Proliferation der myeloischen Blasten mit Akkumulation im Knochenmark und der anschließenden Ausschwemmung in den peripheren Blutkreislauf zurückführen:

- Durch Infiltration des Knochenmarks kann es zur Insuffizienz der regulären Hämatopoese der drei Zellreihen kommen, eine Zellarmut mit Erythrozytopenie (Anämie), Thrombozytopenie und Neutropenie ist die Folge. Symptome einer Anämie sind typischerweise Blässe, Müdigkeit, Belastungsdyspnoe und Tachykardie. Eine Thrombozytopenie kann sich klinisch mit Petechien vor allem an den Extremitäten und



mit Hämorrhagien, Schleimhäute (z.B. oral, nasal) oder das Zentralnervensystem betreffend, manifestieren. Bei verminderten Granulozyten (Neutropenie) kommt es zu Fieber, ohne Nachweis eines Erregers oder eines klassischen Infektfokus'. Sind alle drei blutbildenden Zellreihen betroffen spricht man von einer Panzytopenie (Hiddemann und Bartram, 2010).

- Eine Ausschwemmung von Blasten in die Peripherie nennt man extramedulläre leukämische Infiltration. Betroffen sind hier hauptsächlich Leber und Milz (Hepato- bzw. Splenomegalie), sowie oberflächliche Lymphknoten, aber auch die Haut, das Zahnfleisch (Gingivahyperplasie) und das Zentralnervensystem. In ca. 2 % der Fälle bestehen zusätzlich zur Infiltration extramedulläre Tumore, wie z.B. das Myeloblastom (Hiddemann und Bartram, 2010; Löwenberg et al., 1999).

- Die überschießende Produktion unreifer, nicht funktionstüchtiger Leukozyten, resultiert in einer Leukozytose. Diese wird laborchemisch ab einer Leukozytenzahl  $>11.000/\mu\text{l}$  beschrieben (Abramson und Melton, 2000). Kommt es zu einer extremen Erhöhung der Blasten im peripheren Blutkreislauf spricht man infolgedessen von einer Hyperleukozytose ( $>100.000/\mu\text{l}$ ), die zu einem Leukostasesyndrom mit gravierenden Mikrozirkulationssymptomen vor allem neurologisch und pulmonal führen kann. Kommt es zu keiner extramedullären Manifestation von Blasten, kann sich die Leukozytenzahl auch normal oder mitunter vermindert darstellen (Hiddemann und Bartram, 2010; Löwenberg et al., 1999).

- Eine sogenannte B-Symptomatik, die sich bei allen malignen Neoplasien manifestieren kann, ist ebenfalls gehäuft bei AML-Patienten nachzuweisen. Sie beinhaltet unspezifische Symptome wie Fieber, ungewollten Gewichtsverlust ( $>10\%$  des Körpergewichts innerhalb der letzten sechs Monate) und massiven Nachtschweiß (Herold, 2014; Kouchkovsky und Abdul-Hay, 2016).

Aufgrund der teilweise unspezifischen klinischen Befunde ist eine Diagnosestellung mitunter erschwert. Eine anfängliche Verdachtsdiagnose aufgrund der zuvor beschriebenen Befunde und einem vorliegenden Differentialblutbild, kann mit diversen Routineverfahren gesichert und anschließend klassifiziert werden.

Die Grundlage einer fundierten Diagnostik bildet die Knochenmarkaspiration und eine Knochenmarkbiopsie in Form einer Stanze bzw. Trepanats. Von diesem Material ausgehend schließen sich folgenden Analysen an:

1. Zytomorphologie: Mit Knochenmarksausstrichen oder Knochenmarksbiopsien können lichtmikroskopisch quantitative Aussagen über Myeloblasten und die generelle Gewebemorphologie getroffen werden. Der Nachweis von  $\geq 20\%$  Blasten gilt als beweisend für eine AML (Ausnahme: bei Nachweis von t(15;17), t(8;21) oder inv(16) wird die Diagnose unabhängig der Blastenzahl gestellt; siehe 2.). Weiterhin werden morphologische Kriterien der Blasten detektiert, sodass diese beispielsweise von Blasten einer lymphatischen Leukämie abgegrenzt, bzw. einem myeloischen Subtyp zugeordnet werden können (Döhner et al., 2010).
2. Zytogenetik: Bei mehr als der Hälfte der adulten AML-Patienten lassen sich numerische und strukturelle Chromosomenaberrationen zytogenetisch nachweisen. Bis dato sind mehr als 200 AML-typische Aberrationen wie reziproke Translokationen (t) oder Inversionen (inv) bekannt. Zum Teil sind diese zytogenetischen Anomalien eng mit einem bestimmten Subtyp wie beispielsweise t(15;17) mit der Promyelozytenleukämie verbunden. Neben dieser Aberration ist t(8;21) die am häufigsten vorkommende, die zumeist mit dem Subtyp M2 assoziiert ist (Mrozek et al., 2004).
3. Molekulargenetik: In 75 % der Fälle in denen laut Zytogenetik ein normaler Karyotyp besteht, also keine Chromosomenaberrationen vorhanden sind, können dennoch molekulargenetisch somatisch erworbene, aktivierende Mutationen in bestimmten Genen nachgewiesen werden. Analysiert werden sollten die drei am häufigsten betroffenen Gene: NPM1 (53 %), FLT3 (31 %) und CEBPA (13 %). Hierfür wird eine aus der Knochenmarkbiopsie entnommene DNA-Probe verwendet (Schlenk et al., 2008; Willmann, 1999).
4. Immunphänotypisierung: Mittels Durchflusszytometrie kann die Expression von Oberflächenantigenen (meist CD-Marker; „Cluster of Differentiation“) der Blasten analysiert werden, sodass eine Aussage über deren Zelllinienzugehörigkeit und deren Ausdifferenzierung getroffen werden kann. Myeloisch-assoziierte Antigene sind z.B. CD13, CD14, CD33, CD64, CD117. Weiterhin können Oberflächenmoleküle pluripotenter myeloischer Stammzellen wie CD34 oder CD38 detektiert werden, die einem geringeren Differenzierungsgrad entsprechen (Kumar et al., 2008; Döhner et al., 2010).

Letztendlich besitzen alle vorgestellten diagnostischen Instrumente eine Relevanz sowohl in der Analyse der Kausalität der malignen Erkrankung selbst, als auch in der

anschließenden Therapieplanung und Prognoseabschätzung. Sie werden in den vorhandenen Klassifikationssystemen zusammengefasst (1.1.3).

### 1.1.3 Klassifikation und Prognoseabschätzung

Die AML stellt eine sowohl biologische als auch klinisch heterogene Erkrankung dar, weswegen eine Einteilung auf verschiedene Arten vorgenommen werden kann. Das System der „French-American-British (FAB) Cooperative Group“ beinhaltet den ersten Klassifikationsansatz der AML, der zwischen AML-Typen zu unterscheiden versuchte. Eine Einteilung gelang auf Basis der zytomorphologischen Charakteristika (1.1.2, 1.) der Leukämiezellen und wurde im Jahr 1976 etabliert (Bennett et al., 1976).

**Tabelle 1: FAB-Klassifikation der akuten myeloischen Leukämie mit relativer Häufigkeit (%) der einzelnen Subtypen**

Der häufigste Subtyp stellt die AML M2 gefolgt von M1 und M4 dar.

Tabelle in Anlehnung an Hiddemann und Bartram, 2010.

AML-Subtyp	Relative Häufigkeit (in %)
M0 mit minimaler Differenzierung	3,9
M1 ohne Ausreifung	18,8
M2 mit Ausreifung	33,9
M3 Akute Promyelozyten Leukämie	3,8
M3v Akute Promyelozyten Leukämie, mikrogranuläre Form	0,9
M4 Akute myelomonozytäre Leukämie	18,0
M4eo Akute myelomonozytäre Leukämie, mit Eosinophilie	5,8
M5a Akute Monoblasten Leukämie	4,8
M5b Akute Monozyten Leukämie	5,4
M6 Akute Erythroleukämie	4,3
M7 Akute Megakaryoblasten Leukämie	0,2

Eine anfängliche Klassifikation in sechs Subtypen wurde mehrfach aktualisiert und beinhaltet aktuell je nach Literatur 8-13 Subtypen. Da mit Hilfe der FAB-Klassifikation keine Aussage bezüglich zytogenetischer und molekulargenetischer Kriterien, Prognose und Ätiologie getroffen werden konnte, erstellte die WHO im Jahr 2001 eine neue Einteilung, in die auch die FAB-Kriterien integriert sind und die in regelmäßigen Abständen aktualisiert wird (neueste Überarbeitung: 2016, Tabelle 2)

**Tabelle 2: WHO-Klassifikation der akuten myeloischen Leukämie und deren Prognose**

Dargestellt sind die relevantesten Subtypen. Tabelle in Anlehnung an Kumar et al., 2008; Arber et al., 2016. Tabelle entspricht der aktuellsten Überarbeitung der WHO aus dem Jahr 2016.

<b>I. AML mit rekurrenten genetischen Aberrationen</b>	<b>Prognose</b>
AML mit t(8;21)(q22;q22)	günstig
AML mit inv(16)(p13;q22)	günstig
AML mit t(15;17)(q22;q21.1)	günstig
AML mit t(11q23;variant)	ungünstig
<b>II. AML mit Myelodisplasie-assoziierten Eigenschaften</b>	
mit vorherigem Myelodisplastischen Syndrom	sehr ungünstig
ohne vorheriges Myelodisplastisches Syndrom	ungünstig
<b>III. AML und Myelodisplastisches Syndrom, therapieassoziiert</b>	
alkylantieninduziert	sehr ungünstig
epipodophyllotoxininduziert	sehr ungünstig
<b>IV. AML ohne weitere Spezifizierung</b>	
entspricht der FAB-Klassifikation (M0-M7)	intermediär
<b>V. Akute Leukämien unklarer Linienzugehörigkeit</b>	
Akute undifferenzierte Leukämie	-
Akute bilineäre Leukämie	-

Die WHO-Klassifikation stellt aktuell die wichtigste Grundlage der Prognose und somit der klinischen Therapieentscheidung dar. Wie mehrere multizentrische Therapiestudien zeigen konnten, ist der Karyotyp der leukämischen Blasten der prognostische Faktor mit der höchsten Relevanz und Unabhängigkeit (Tabelle 2, WHO I). Beispielsweise sind die balancierten Translokationen mit einer günstigen Prognose assoziiert (Niedrigrisikoprofil), während komplexe Aberrationen (t(11q23;variant)) als ungünstig angesehen werden können (Hochrisikoprofil). Die AML mit einem physiologischen Karyotyp entspricht dem intermediären Risikoprofil. Geringere Bedeutung hinsichtlich der Prognoseabschätzung haben Parameter wie Alter des Patienten, Höhe der Leukozytenzahl und eine eventuelle sekundäre Genese (WHO II und III) (Hiddemann und Bartram, 2010).

### 1.1.4 Therapeutische Konzepte

Zur Definierung einer Therapiestrategie anhand der WHO-Klassifikation gilt es, den Gesamtzustand des Patienten sowie seine generelle Therapiefähigkeit zu eruieren und zwischen einem kurativen oder palliativen Therapieregime zu entscheiden. Zur Entscheidungsfindung beitragen kann neben dem Willen des Patienten (!) ein entwickelter Score ([www.AML-Score.org](http://www.AML-Score.org)), der Kriterien wie Alter, Blutbild und molekulare bzw. zytogenetische Risikoklassifizierung beinhaltet. Ebenso kann sich am ermittelten Wert des „Performance-Status“ der „Eastern Cooperative Oncology Group“ (ECOG) orientiert werden (Okken et al., 1982). Eine vorherige Risikostratifikation mit Nutzenabschätzung der geplanten Therapie ist absolut essentiell, da eine Meta-Analyse zeigte, dass 15-20 % in der Gruppe der über 75-jährigen an den Nebenwirkungen intensiver Chemotherapie verstarben (Krug et al., 2011).

Die Basis der AML-Therapie in kurativer Intension stellt leitliniengerecht eine intensive Chemotherapie dar. Sie gliedert sich in Induktions- und Postremissionstherapie. Ziel der Induktionstherapie ist es, die Masse der leukämischen Blasten deutlich zu minimieren und eine komplette Remission („complete remission“, CR) zu erreichen. Diese ist definiert als Reduktion der Blasten  $<5\%$  im peripheren Blut sowie eine Wiederherstellung einer physiologischen Anzahl aller drei Zellreihen (z.B. Thrombozytenzahl  $\geq 100.000/\mu\text{l}$ ) (Krug et al., 2011). Anschließend folgt die Postremissionstherapie (Konsolidierungsphase) zur Eliminierung etwaiger leukämischer Stammzell-Residuen (entspricht minimaler Resterkrankung, „minimal rest disease“, MRD) und zur Erhaltung der kompletten Remission (Hiddemann und Bartram, 2010).

Induktionstherapie: Die international anerkannte Standard-Induktionstherapie erfolgt nach dem sogenannten „3+7-Schema“ (Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie, DGHO). Es beinhaltet die Kombination eines Anthrazyklins (z.B. Daunorubicin,  $60\text{ mg/m}^2$ ) für drei Tage plus die siebentägige, kontinuierliche Gabe von Cytosin Arabinosid (Cytarabin; Ara-C) in der Dosierung von  $100\text{-}200\text{ mg/m}^2$  (DGHO). In der Altersgruppe der Patienten  $\geq 75$  Jahre erreichen 30-40 % eine CR (Southam et al., 1951). Patienten, die kein Ansprechen auf zwei Therapiezyklen zeigen, gelten als refraktär und müssen einer Rezidivtherapie zugeführt werden. Neue Studien zeigen, dass anhand des Biomarkers SAMHD1 noch vor Therapiebeginn ein Anschlagen der Cytarabin-basierten Chemotherapie prognostiziert werden kann (Schneider et al., 2017).

SAMHD1 ist eine Desoxyribonukleosidtriphosphat-(dNTP)-Triphosphohydrolase, die die chemische Reaktion des Abbaus des aktiven Metaboliten von Cytarabin katalysiert und somit dessen Toxizität in den AML-Blasten reduziert. Zukünftig könnte daher die Expression von SAMHD1 in AML-Patienten prätherapeutisch bestimmt werden und nicht-Cytarabin-sensiblen Patienten evtl. schwere Nebenwirkungen erspart bleiben. Darüber hinaus könnte SAMHD1 nicht nur als Marker herangezogen werden, sondern ebenfalls einen Angriffspunkt in der Therapie Cytarabin-refraktären AML darstellen.

Postremissionstherapie: Nach erfolgter Induktionstherapie und erreichter CR muss sich eine Konsolidierungstherapie, deren Ziel die Verhinderung eines Rezidivs ist, anschließen. Diese kann entweder mittels Chemotherapie und Cytarabin weitergeführt werden oder es kann alternativ eine Myeloablation mit anschließender allogener Stammzelltransplantation (SZT) diskutiert werden. Vor allem jüngeren Patienten mit zytogenetisch oder molekulargenetisch definierten Hochrisiko-AML-Profilen profitieren von einer Transplantation (Schmid et al., 2008). Nicht induziert ist eine SZT bei Trägern der inv(16) oder Mutation des NPM1 Gens (Niedrigrisikoprofil). Hier wurde ein Langzeitüberleben von >60 % auch ohne allogene SZT nachgewiesen (Hiddemann und Bartram, 2010). In der Altersgruppe der älteren Patienten mit Hochrisikoprofil muss individuell entschieden werden und stets die transplantationsbedingte Mortalität (z.B. „Graft-versus-Host-Disease“, Infektionen unter Neutropenie) mitberücksichtigt werden.

Fällt die Entscheidung zugunsten eines palliativen Therapieregimes, z.B. aufgrund eines hohen Alters, eines niedrigen „Performance-Status“ oder mehrerer Komorbiditäten, wird eine nicht-intensive Chemotherapie durchgeführt (z.B. 20 mg Cytarabin subkutan zweimal täglich für zehn Tage). Obwohl diese ohne kurative Intention ist, konnte dennoch gezeigt werden, dass die Mortalität bei Patienten mit Niedrigrisikoprofilen gesenkt werden konnte. Patienten mit Hochrisikoprofil konnten von der niedrig-dosierten Therapie nicht profitieren (Burnett et al., 2007). Weiterhin besteht die Möglichkeit hypomethylierende Substanzen wie beispielsweise 5-Azacytidin einzusetzen, da diese überlebenszeitverlängernd wirken können und höhere Ansprechraten als niedrigdosiertes Cytarabin zeigten (Fenaux et al., 2010).

Zielgerichtete Therapie: Durch das sehr heterogene, polygenetische wie polymorphe, Erkrankungsmuster ist die Entwicklung spezifischer bzw. zielgerichteter Therapien

schwierig. Dennoch sind einige Ansätze zur klinischen Anwendung zugelassen. Dazu gehören unter anderem Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI), die die FLT3-Tyrosinkinase FLT3-ITD-positiver AML und damit leukämietypische Signaltransduktionswege inhibieren. Sie zeigen vor allem bei therapierefraktären Patienten gute Wirkung. TKIs der ersten Generation sind beispielsweise Sorafenib (Metzelder et al., 2010) oder Midostaurin (Fischer et al., 2010).

Bislang ist im Rahmen dieser vorgestellten zielgerichteten Therapeutika gegen AML noch keine Entwicklung gelungen, die die Chemotherapie als leitliniengerechte Standardtherapie ablösen konnte. Ihr Einsatz ist derzeit lediglich von additivem Charakter.

Immuntherapie der AML: Unter dem Begriff der Immuntherapie werden Behandlungsformen zusammengefasst, die das körpereigene Immunsystem zu beeinflussen vermögen. Im Rahmen der Onkologie werden zur Therapie maligner Erkrankungen zum einen stimulierende Verfahren zur Aktivierung der körpereigenen Immunsystem (aktive Immunisierung) zum anderen substituierende Verfahren (passive Immunisierung), z.B. mit monoklonalen Antikörpern (1.2) eingesetzt (Rosenberg et al., 2004).

Im Rahmen einer passiven und zielgerichteten Immuntherapie erfolgte die Entwicklung eines monoklonalen Antikörpers (AK): Gemtuzumab-Ozogamicin (GO, Mylotarg®). Es handelt sich hierbei um ein Konjugat bestehend aus einem AK gegen CD33 und dem zytotoxisch-wirkenden Stoff Calicheamicin (Gasiorowski et al., 2014). CD33 ist ein Leukämie-assoziiertes Antigen (LAA), das auf der Oberfläche von AML-Blasten bei nahezu 80 % aller Patienten exprimiert wird. Nach rezeptorvermittelter Bindung an die Zelloberfläche und Internalisierung wird die zytotoxische Substanz intrazellulär freigesetzt. Eine Zerstörung der DNA hat die Apoptose des Blasten zur Folge. Obwohl anfänglich eine gute Wirksamkeit, vor allem in der Gruppe der Erkrankten mit Niedrigrisikoprofil, verzeichnet werden konnte, wurde das AK-Konjugat 2008 mit der Begründung nicht beherrschbare Nebenwirkungen auszulösen (langanhaltende Myelosuppression und hohe Lebertoxizität) vom Markt genommen (European Medicines Agency, 2008).

Weitere monoklonale AK gegen CD33 oder CD123 finden sich aktuell in klinischen Studien. Wann und ob es zu Zulassungen innerhalb der Europäischen Union kommt, ist bis dato unklar (DGHO, Stand: 2017).

Eine weitere Therapiestrategie stellt die Verabreichung von Zytokinen wie Interleukinen (IL), IL-2 oder IL-15, zur Steigerung der Aktivität natürlicher Killerzellen und zytotoxischer T-Lymphozyten und damit der tumorspezifischen Immunantwort *in vivo* dar. Dadurch erreichte ein Teil der behandelten Patienten in partieller Remission eine komplette Remission (Macdonald et al., 1990).

Darüber hinaus besteht die Möglichkeit der Vakzinierung mit AML-Antigen-präsentierenden dendritischen Zellen, die aus patienteneigenen Stammzellen oder Makrophagen gewonnen werden können (Duncan und Roddie, 2008). Dieser Therapieansatz zählt ebenso wie die Therapie mit Interleukinen zu den aktiven immuntherapeutischen Strategien (Barrett und Le Blanc, 2010).

Weitere immuntherapeutische Ansätze, deren Risiko-Nutzen-Verhältnis zurzeit noch in (klinischen) Studien untersucht wird, sollen in der Diskussion (5.3) erläutert werden.

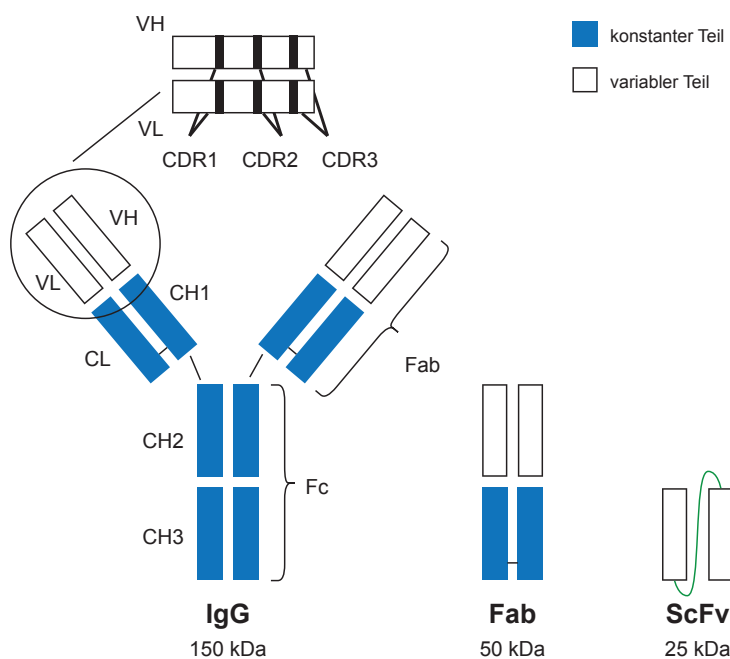
## 1.2 Antikörper

Antikörper (AK) bzw. Immunglobuline sind Proteine, die als Reaktion auf Antigene von ausdifferenzierten B-Lymphozyten, den Plasmazellen, gebildet und sezerniert werden. Sie sind Teil der adaptiven, humoralen Immunantwort in Wirbeltieren (Tsumoto und Caaveiro, 2016). Antigene, die die Bildung von AK auslösen, können verschiedenen Ursprungs sein. Prinzipiell hat jedes Makromolekül, das auf Oberflächen zugänglich ist, antigenisches Potential (Sundberg und Mariuzza, 2012). Diese Moleküle, genannt Epitope, sind meist jedoch Proteine, Glykoproteine oder Polysaccharide von pathogenen Erregern. Die Funktion des AK-Moleküls besteht darin, das Pathogen des Erregers spezifisch zu binden, dieses dadurch zu markieren (Opsonierung) und es anschließend für Phagozyten und das Komplementsystem, die es zerstören, zugänglich zu machen. Eine Immunantwort *in vivo* ist stets polyklonal. B-Zellen produzieren AK gegen viele verschiedene Oberflächenantigene (Epitope) eines pathogenen Erregers. Der Ursprung monoklonaler Antikörper geht allerdings nur auf einen einzigen B-Zell-Klon zurück. Diese sind identischer Struktur und richten sich alle gegen das identische Epitop (Janeway et al., 2009).

Struktur von Antikörpern: Der Aufbau von AK-Molekülen kann mit der Form eines „Y“ gleichgesetzt werden. Sie sind aus vier Polypeptidketten aufgebaut, zwei jeweils



identischen leichten („light“, 25 kDa) und schweren Ketten („heavy“, 50 kDa), sodass sie eine relative Molekülmasse von 150 kDa aufweisen. Man unterscheidet zwei Typen von leichten Ketten, die man als Lambda- ( $\lambda$ ) und Kappa- ( $\kappa$ ) Kette bezeichnet, wobei ein Immunglobulin entweder nur  $\lambda$ -Ketten oder  $\kappa$ -Ketten aufweist (Tsumoto und Caaveiro, 2016). Die zwei schweren Ketten sind untereinander und mit den leichten Ketten durch Disulfidbrücken verbunden (Davies et al., 1990). Pro AK-Molekül sind die beiden schweren und leichten Ketten jeweils identisch. Daraus ergeben sich zwei Antigenbindungsstellen, sodass jeder AK zwei identische Antigene parallel binden kann (bivalente Bindung). Jede der vier Polypeptidketten besitzt neben einer variablen Region (V-Region) am N-terminalen Ende, die von AK zu AK unterschiedlich ist und die antigenbindende Region darstellt, auch eine konstante Region (C-Region) am C-terminalen Ende, die für die Effektormechanismen des Immunsystems verantwortlich ist. Dieses Fc-Fragment („fragment crystallizable“, kristallisierbares Fragment) wird allein durch die schwere Kette gebildet und variiert nicht in gleichem Maße wie die V-Region. Es legt gleichzeitig den Isotyp, sprich die AK-Klasse des AK fest (IgM, IgD, IgG, IgA und IgE) (Wang et al., 2007; Janeway et al., 2009).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung eines IgG-Antikörpers und seiner funktionellen Fragmente**  
Antigenbindungen können nicht nur durch Vollängenantikörper, sondern auch durch Fab-Fragmente („fragment antigen binding“) oder Einzelkettenantikörper („single-chain variable Fragment“, scFv) erreicht werden. Bei einem Fab-Fragment handelt es sich um die variablen Domänen, die mit der leichten und schweren Kette der konstanten Region verbunden sind. Das scFv besteht lediglich aus  $V_H$  und  $V_L$ , die über ein Verbindungspeptid („linker“) miteinander verknüpft sind. Trotz seiner geringen molekularen

Masse (ca. 25 kDa) besitzt es die vollständige Antigenbindungsdomäne. Das Fc-Fragment („fragment crystallizable“) besitzt keine antigenbindende Aktivität, es interagiert mit den Effektorzellen.

Abbildung: Eigene Darstellung in Anlehnung an Janeway et al., 2009.

Die Spezifität (Diversität) eines AK kommt durch unterschiedliche Kombinationen von variablen Regionen schwerer ( $V_H$ ) und leichter Ketten ( $V_L$ ) zustande. Drei hypervariable Regionen (HV1-3), die durch randomisierte Verteilung der Aminosäuren in der Primärstruktur zustande kommen, bilden die antigenspezifische Oberflächenstruktur. Man nennt sie komplementaritätsbestimmende Regionen („complementarity determining regions“, CDR1-3). Sie sind von den Gerüstregionen („framework regions“, FR1-4) mit geringerer Variabilität umgeben (Janeway et al., 2009; Tsumoto und Caaveiro, 2016).

Eine AK-Antigen-Bindung lässt sich durch unterschiedliche Eigenschaften charakterisieren. Unter der Spezifität versteht man die Fähigkeit, das eigene bzw. passende Immunogen von fremden zu unterscheiden (Sundberg et al., 2000). Die Bindungsstärke einer Bindung kann durch Affinität und Avidität klassifiziert werden, wobei die Affinität die Stärke der Bindung zwischen einer einzigen Antigenbindungstelle und einem monovalenten Antigen beschreibt. Die Avidität hingegen ist als gesamte Bindungsstärke eines Moleküls mit mehr als einer Bindungsstelle definiert (Vorup-Jensen, 2012).

Die Rolle der Antikörper in der Immunonkologie: Durch die hohe Spezifität eines Antikörpers gegenüber seinem zugehörigen Immunogen und dem damit verbundenen hohen Potential als präzises diagnostisches und therapeutisches Mittel zu fungieren, ist der Einsatz monoklonaler AK schon seit längerer Zeit in der Onkologie etabliert (Sanchez-Martin et al., 2015). In der Diagnosestellung stehen AK unter anderem in der Immunhistochemie (IHC), der Durchflusszytometrie, zur Radioimmunodetektion in der Szintigraphie und für Immunoassays zur Verfügung (Goldenberg, 1993). Die therapeutische Wirkung monoklonaler AK basiert auf antikörperabhängiger zellvermittelter Zytotoxizität („antibody-dependent cytotoxicity“, ADCC), Inhibition der Signaltransduktion in die Zelle durch Ligand-Rezeptor-Kommunikation oder einer Aktivierung des körpereigenen Komplementsystems (Krauss, 2003). Durch eine optionale Kopplung mit Immunkonjugaten, z.B. Toxine, kann die therapeutische Wirkung mitunter noch verstärkt werden (Goldenberg, 1993).

Rituximab, ein humanisierter AK gegen CD20-positive B-Zell-Lymphome, gilt als der erste zugelassene monoklonale AK (im Jahr 2000) in der onkologischen Therapie (Grillo-Lopez et al., 2000). Neben Rituximab sind unter anderen Blinatumomab (Anti-CD19&13) und Inotuzumab (Anti-CD22) gegen ALL und Mogamulizumab (Anti-CCR4) gegen Non-Hodgkin-Lymphome und adulte T-Zell-Leukämie in der Therapie hämatologischer Neoplasien innerhalb der Europäischen Union zugelassen (Sanchez-Martin et al., 2015).

Eine stets aktuelle Liste aller zur Therapie zugelassenen monoklonalen AK kann online auf der Internetseite des Paul-Ehrlich-Instituts eingesehen werden.

### 1.3 Generierung spezifischer Antikörperfragmente mit Hilfe der Phage-Display-Technologie

Das Phage-Display stellt die momentan bedeutendste, da effektivste und einfachste *in vitro* Methode zur Generierung spezifischer rekombinanter AK-Fragmente dar (Hudson, 2000). In den folgenden Kapiteln sollen Charakteristika dieser Methode fundiert dargestellt werden.

#### 1.3.1 Das Prinzip der Phage-Display-Technologie

Im Rahmen der Phage-Display Technologie werden Proteine bzw. Peptide z.B. Antikörper in Form von scFv- oder Fab-Fragmenten auf der Oberfläche filamentöser Bakteriophagen präsentiert, dadurch bestimmten Zielantigenen zugänglich gemacht und aus einer Phagemid-basierten AK-Bibliothek mit ausreichender Größe und Diversität isoliert (Winter et al., 1994). In einem kurzen Zeitraum von zwei Wochen ist es so möglich ELISA-positive monoklonale AK jedweder gewünschten Spezifität generieren zu können (Bradbury et al., 2011).

Mitte der 1980er Jahre wurde das Prinzip von George Smith initiiert. Dieses minimierte im Laufe der 1990er Jahre die Relevanz der Hybridoma-Technologie als Methode zur Herstellung rekombinanter AK. Unter rekombinanten AK versteht man gentechnisch durch Klonierung in Expressionsvektoren hergestellte AK (Krauss, 2003). Bei der Hybridoma-Technologie werden Hybride aus AK-produzierenden B-Lymphozyten und Myelomzellen erzeugt, die in der Lage sind, große Mengen an monoklonalen AK zu generieren (Köhler und Milstein, 2005). Im Gegensatz zur Hybridoma-Technologie gelang es Smith, Genotyp und Phänotyp direkt miteinander zu verknüpfen, indem die

DNA eines entsprechenden Proteins mit dem Phagenhüllprotein fusioniert wird, sodass der Bakteriophage parallel zur Oberflächenpräsentation des Proteins auch die entsprechende replikationsfähige Nukleinsäure in sich trägt (Smith, 1985). Durch diesen Genotyp-Phänotyp-Komplex ist es möglich, direkt nach Isolation eines Peptids auch parallel dessen genetischen Code nachzuweisen.

Durch die Effektivität der Herstellung spezifischer rekombinanter AK-Fragmente erlangte die Methode auch in der Produktion von Pharmazeutika, z.B. zur Herstellung von Impfstoffen, in den letzten Jahren eine hohe Bedeutsamkeit (Qi et al., 2012).

Darüber hinaus findet die Phage-Display-Technologie beispielsweise Anwendung zur Identifizierung eines Epitops bei zuvor bereits bekanntem zugehörigem monoklonalen AK (Mayrose et al., 2007) oder beim Screening des Liganden eines Rezeptors (Qi et al., 2012).

### 1.3.2 Phage-Display-Bibliotheken

Eine Phage-Display-Bibliothek beinhaltet eine Sammlung rekombinanter Phagen, von denen jeder eine antigenbindende Domäne präsentiert (Janeway et al., 2009). Beim Phage-Display können Antikörpergenbibliotheken verschiedenen Ursprungs genutzt werden. Man unterscheidet hierbei zwischen immunisierten, naiven und synthetischen (bzw. semi-synthetischen) Bibliotheken. B-Zell mRNA, die z.B. aus Knochenmark oder Lymphknoten von humanen Spendern isoliert wird und anschließend in einen Phagenexpressionsvektor (Phagemid) kloniert wird, bildet die Grundlage der genetischen Information, die für AK-Fragmente einer naiven Bibliothek codiert (Marks et al., 1991).

Immunisierte Bibliotheken basieren dagegen auf *in vivo* generierter Diversität der humoralen Immunantwort eines mit einem Antigen immunisierten Spenders. Da die Größe solcher Bibliotheken nur ca.  $10^7$  beträgt, finden immunisierte Bibliotheken nur dann Anwendung, wenn gegen ein zuvor bekanntes Antigen hochaffin selektioniert werden soll (Burton et al., 1991).

Die Größe der Bibliothek korreliert positiv mit der Wahrscheinlichkeit, einen hochspezifischen Binder zu isolieren (Winter et al., 1994). AK-Bibliotheken mit größerer Diversität ( $> 10^8$ ) sind neben den zuvor beschriebenen naiven auch synthetisch hergestellte Bibliotheken. Eine hohe Diversität des AK-Repertoires wird hier durch Poly-

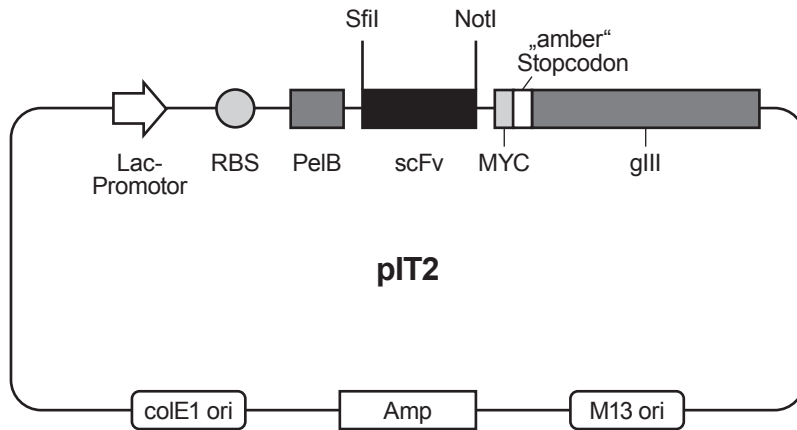
merase-Ketten-Reaktion (PCR) mit synthetischen, randomisierten Oligonukleotidsequenzen erreicht (Hoogenboom et al., 1992; Luttmann, 2014).

In vorliegender Arbeit wurde mit den humanen, semi-synthetischen, Phagemid-basierten scFv-Antikörper-Bibliotheken Tomlinson I und J gearbeitet. Sie stammen vom Medical Research Council HGMP in Cambridge, Großbritannien.

Jede Tomlinson Bibliothek beinhaltet über 100 Millionen verschiedene scFv-Fragmente, die in einen Phagemid-Vektor (pIT2) geklont und anschließend in TG1 *Escherichia coli* (*E. coli*) Bakterien transformiert wurden. Bei diesen handelt es sich um Fertilitätsfaktor-tragende *E. coli* Zellen ( $F^+$ -*E. Coli*).

Die hohe Diversität der Bibliotheken (I:  $1,47 \times 10^8$  und J:  $1,37 \times 10^8$ ) wurde durch randomisierte Mutagenese der CDR's der  $V_H$  und  $V_L$  unter Anwendung des DVT- (für I) und NNK-Schemas (für J) erreicht. (D= Adenin, Guanin oder Thymin; V= Adenin, Cytosin oder Guanin; T= Thymin; K= Thymin oder Guanin; N= jede beliebige Nukleobase) (Tomlinson, I. - Tomlinson Manual).

Bei Phagemid-Vektoren handelt es sich um abgeleitete Vektoren, die im Gegensatz zu einem Wildtyp Phagenvektor, der dem eigentlichen Phagenom entspricht (1.3.3), reduzierte genetische Informationen tragen (Qi et al., 2012). Neben den genetischen Sequenzen der scFv-Fragmente, bestehend aus einer  $V_H$ - und  $V_L$ -Domäne, die miteinander durch einen flexiblen Glycerin-Serin-Linker verbunden sind und N-terminal an ein gIII-Hüllprotein fusioniert sind (scFv-gIII-Fusionsgen), weist das Phagemid unter anderem virale und prokaryotische Replikationsursprünge (M13 ori und colE1 ori), sowie eine Ampicillin-Resistenz auf. Gensequenzen, die für Proteine, die die DNA-Replikation und den Zusammenbau der Phagen katalysieren, codieren, sowie die Hüllproteine selbst repräsentieren, fehlen dem Phagemid.



**Abbildung 2: Schematische Darstellung des pIT2-Vektors (Phagemid) der Tomlinson Bibliotheken**

Der Lac-Promotor reguliert die Expression der Gensequenzen und ist dem scFv-gIII-Fusionsgen vorgeschaltet. Die ribosomale Bindungsstelle (RBS) markiert den Startpunkt der Ribosomen während der Transkription. Auf die codierenden Sequenzen für  $V_H$  und  $V_L$  folgt das MYC-Gen, das zur Markierung bei Detektionen oder Reinigungsprozessen dient. Vor der gIII-Sequenz findet sich ein „amber“ Stopcodon (TAG), das in „Suppressor“-*E. coli*-Stämmen als Glutamin transkribiert wird. Durch Erhöhung der Diversität der Bibliotheken mit Hilfe des NNK-Schemas kommt es in 3 % der Klone zum Einbau eines TAG-Stopcodons.

Abbildung: Eigene Darstellung in Anlehnung an Tomlinson, I. - Tomlinson Manual.

In etlichen Vorversuchen auf unterschiedlichen Geweben innerhalb unserer Arbeitsgruppe (Daten nicht gezeigt) zeigten scFv-Fragmente aus Bibliothek I immer deutlich geringere Bindungsaktivitäten, als die isolierten scFv-Konstrukte aus J, weswegen im weiteren Verlauf das scFv-Repertoire der Bibliothek I nicht weiter berücksichtigt wurde.

### 1.3.3 Formate des molekularen Displays

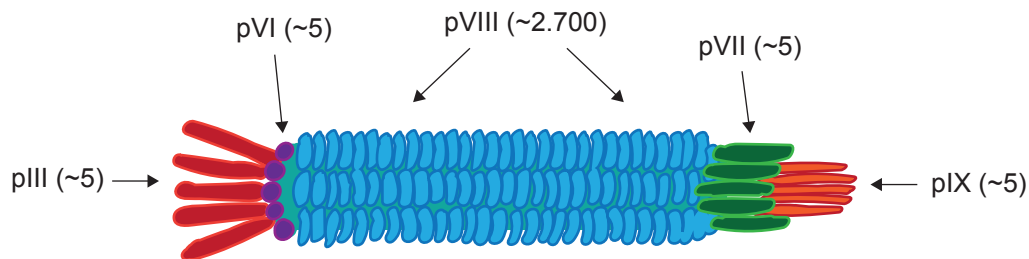
Zur Generierung spezifischer AK-Fragmente sind unterschiedliche Formate des molekularen Displays etabliert. Das am meisten angewendete Phage-Display kann entweder *in vivo* oder *in vitro* durchgeführt werden. Darüber hinaus kommen Display-Methoden auf Zellen zum Einsatz. Genutzt werden hier Bakterien-, Hefe- oder Säugerzellen. Zusätzlich zum Phage-Display ist das Display mit Ribosomen, mRNA und DNA als *in vitro* Methode beschrieben (Sergeeva et al., 2006).

Da eine Isolierung spezifischer AK-Fragmente in vorliegender Arbeit mittels Phage-Display durchgeführt wurde, soll nur auf dieses Display-Format im Folgenden näher eingegangen werden.

Bakteriophagen (Kurzform: Phagen) sind Viren, die Bakterien und Archaeen als Wirtszellen nutzen (Ackermann et al., 1978). Dem Phagemid der  $F^+$  *E. coli* Bakterien

fehlen codierende Sequenzen für Replikation und Zusammenbau von Phagenpartikeln, daher ist zur Herstellung scFv-präsentierender Phagenpartikel die Infektion mit Helferphagen, die das vollständige Phagen genom aufweisen, von essentieller Bedeutung. Im Rahmen der Phage Display-Technologie werden filamentöse Bakteriophagen der Ff-Klasse eingesetzt: f1, fd und M13 (Barbas et al., 2004).

Das den größten Teil der Phagenoberfläche bedeckende Molekül repräsentiert das pVIII-Hüllprotein („major-coat-protein“), das in einer Anzahl von ca. 2700 Molekülen auf der Oberfläche vorhanden ist. An seinen Enden weist der Ff-Bakteriophage vier verschiedene Hüllproteine („minor-coat-protein“) auf, die jeweils in fünffacher Ausführung die Oberfläche bedecken: pIII und pVI am distalen, pVII und pIX am proximalen Ende. Die Präsentation von Proteinen an der Phagenoberfläche wird am häufigsten durch Fusion mit dem pIII-Hüllprotein (scFv-gIII-Fusionsgen, 1.3.2) (Smith, 1985), gefolgt von der Fusion ans pVIII-Protein, durchgeführt (Qi et al., 2012).



**Abbildung 3: Schematische Darstellung eines M13-Bakteriophagen aus der Klasse der Ff-Phagen**

Die Länge des M13-Phagen beträgt 930 nm bei einem Durchmesser von 6,5 nm. Seine Einzelstrang-DNA (ss-DNA) ist zirkulär angeordnet und besteht aus ca. 6400 Nukleotiden. Fünf unterschiedliche Hüllproteine bedecken seine Oberfläche, wobei pVIII mit ca. 2700 Kopien den quantitativ höchsten Anteil der Hüllproteine ausmacht (Barbas et al., 2014).

Abbildung: Eigene Darstellung in Anlehnung an Miller, 2016.

Für eine erfolgreiche Infektion der Phagemid-tragenden Antikörperbibliotheken mit Bakteriophagen, gilt es einige variable Aspekte zu berücksichtigen:

1. Auswahl des effektivsten Helferphagen in Abhängigkeit der Selektionsrunde
2. Einhaltung der Multiplizität der Infektion („multiplicity of infection“, MOI)
3. Einhaltung des Infektionszeitpunkts (log-Wachstumsphase der *E. coli* Bakterien)

Zu 1.: Durch gezielte Auswahl des Helferphagen kann die Valenz der scFv-Fragmente bestimmt werden. Bei polyvalenter Expressierung der AK an der Phagenoberfläche kann die Avidität bzw. die Gesamtaffinität (1.2) eines Binders aus der Originalbibliothek zum

Antigen erhöht werden. Dies ist vor allem in der ersten Selektionsrunde von Relevanz, in der jeder Klon nur zu ca. einem Prozent repräsentiert wird (Marks et al., 1991). Daher kann statt eines Helferphagen ein Hyperphage mit gIII-Deletion (M13K07 $\Delta$ pIII) eingesetzt werden, der ausschließlich das scFv-pIII-Fusionsprotein in seine Hülle einbaut, was 5 AK pro Phage entspricht (Rondot et al., 2001). Somit kann ein Verlust der Diversität in der ersten, der wichtigsten Runde, unterbunden werden (Christ, 2010). Um in den folgenden Runden einen Selektionsvorteil für starke Binder zu schaffen, werden hier M13K07 Helferphagen, die AK monovalent auf ihrer Oberfläche präsentieren (0-5 pro Phage), verwendet. Hierbei macht man sich die Stärke einzelner Paratop-Epitop-Bindungen zu Nutze (Affinität) (Luttmann, 2014).

Zu 2.: Unter MOI versteht man ein festgelegtes Infektionsverhältnis infektiöser Agenzien (Phagen) zu deren Wirtszellen (*E. coli* Bakterien). Es gilt hier eine MOI von  $\geq 20$  einzuhalten. Dies entspricht einer Infektionsrate von 20 Phagen pro zu infizierendem Bakterium. Mit diesem Verhältnis soll die Wahrscheinlichkeit, dass ein Bakterium von einem Phagen infiziert wird, erhöht werden, sodass die Effizienz der Infektion steigt (Russel et al., 2014).

Zu 3.: Die Infektion erfolgt über in der logarithmischen Wachstumsphase ausgebildete F-Pili von Fertilitätsfaktor-tragenden *E. coli* Bakterien, die mit dem pIII-Hüllprotein des Helferphagen interagieren und dieses binden. Unter Zurückziehen der Pili gelingt eine Internalisierung des Phagen (Deng et al., 1999). Darüber hinaus gilt es, eine optimale Temperatur für die Infektion einzuhalten. Diese sollte mindestens 34 °C betragen (Russel et al., 2014).

Nach abgelaufener Infektion mit anschließender DNA-Replikation, Synthese der einzelnen Hüllproteine und dem Zusammenbau (Assemblierung) innerhalb der Zytoplasmamembran der *E. coli* Bakterien, werden die Phagenpartikel ohne Zerstörung des Bakteriums von diesem sezerniert. Daher kann die Ff Phagen-Klasse als nicht-lytische Viren beschrieben werden (Sergeeva et al., 2006).

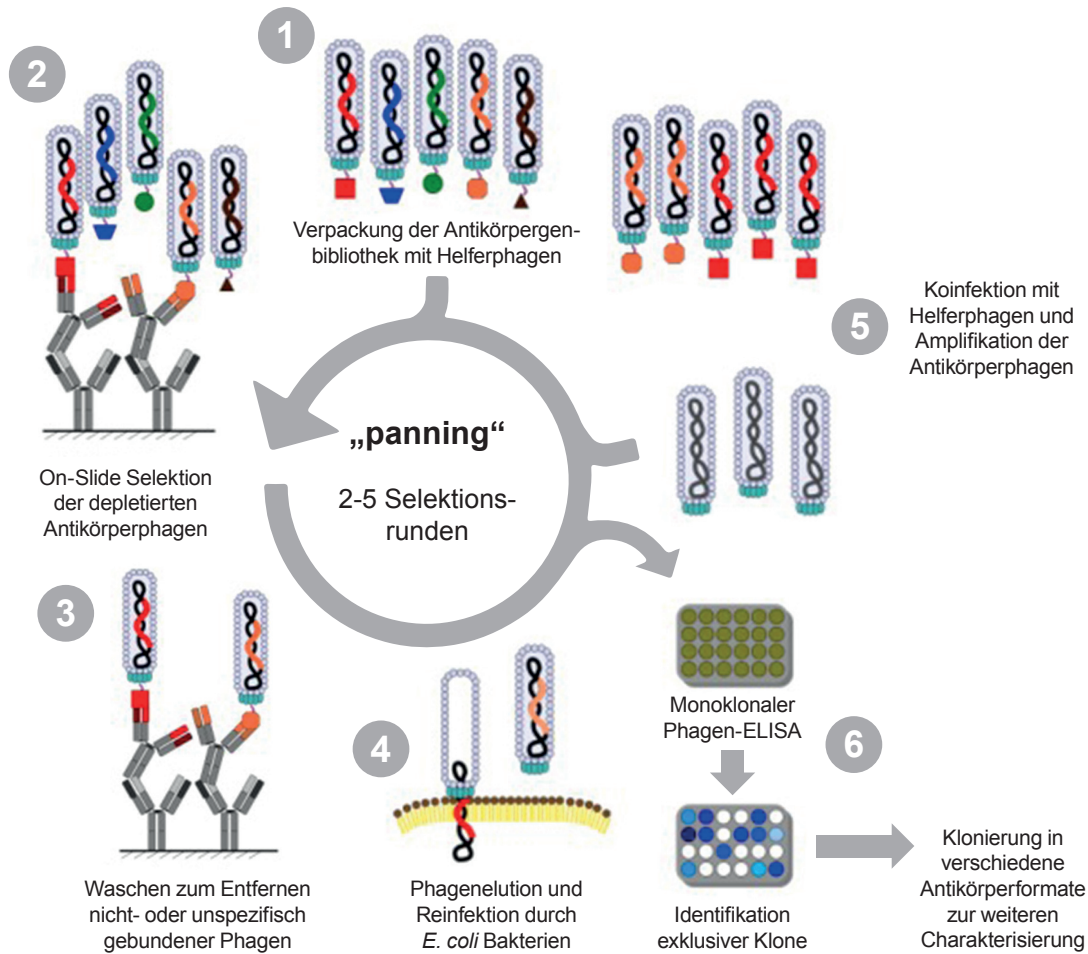
#### 1.3.4 Ablauf der „panning“-Runden

Nach Trennung der amplifizierten Phagen von den *E. coli* Bakterien, der sogenannten Phagenfällung, folgt die eigentliche *in vitro* Selektion auf ausgewählten Antigenen. Dieser Prozess wird als „biopanning“ (Kurzform: „panning“) bezeichnet und imitiert die körpereigene, natürliche Selektion durch B-Lymphozyten bei Kontakt mit einem



Antigen: Gebundene B-Zellen werden *in vivo* zur Proliferation und AK-Produktion angeregt, sodass nicht-bindende im Zuge der Proliferation an Relevanz verlieren (Winter et al., 1994).

Um nicht-spezifische Binder mit einer Kreuzreaktivität zu irrelevanten Oberflächenmolekülen auszuschließen, kann vor der eigentlichen Selektion eine „Negativ-Selektion“, die sogenannte Depletion, durchgeführt werden (Watkins und Ouwehand, 2000). Die Auswahl des Depletionsgewebes bzw. Antigens kann, sowie andere Modalitäten, wie beispielsweise Dauer und Temperaturbedingungen individuell auf den Selektionsprozess abgestimmt werden. Nach erfolgter Negativ-Selektion wird das Phageneluat auf die entsprechenden Antigene des Selektionsmaterials überführt. Die Phagensuspension inkubiert unter individuellen, aber zuvor festgelegten Konditionen (pH- und Temperatur-Bedingungen, Dauer) (Barbas et al., 2004) auf den immobilisierten Antigenen. Nicht-gebundene Phagen werden anschließend mittels intensiver Waschschriffe entfernt. Dabei gilt es, eine steigende Stringenz des Waschprozesses von Runde zu Runde anzustreben, um eine Isolierung der spezifischsten Binder nach und nach zu gewährleisten (Smith und Petrenko, 1997). Die Elution der gebundenen Phagen wird durch Trypsin als Verdauungsenzym oder Lösungen mit extremen pH-Werten, niedrig oder hoch, erreicht. Beschrieben ist beispielsweise die Verwendung von Glyzin-HCl (pH 2,2) oder 0,1 M TEA Puffer (pH 12,2) (Barbas et al., 2004).



#### Abbildung 4: Schematische Darstellung des Ablaufs der „panning“-Runden zur Selektion spezifischer Antikörper

Zur Selektion spezifischer AK werden scFv-Konstrukte der Tomlinson Bibliothek als infektiöse AK-präsentierende Phagenpartikel hergestellt (1) und zur On-Slide Selektion auf FFPE-Gewebeschnitte von AML-Patienten überführt (2). Durch stringentes Waschen werden ungebundene und unspezifisch-bindende Phagenpartikel entfernt (3). *E. coli* Bakterien werden nach Elution der spezifisch-gebundenen Phagen mit diesen reinfiziert (4), sodass es nach wiederholter Koinfektion durch Helferphagen zur erneuten Amplifikation AK-präsentierender Phagenpartikel kommt (5), mit denen eine neue Selektionsrunde begonnen (1) oder eine initiale Charakterisierung mittels monoklonalem ELISA (6) erfolgen kann.

Abbildung: Eigene Darstellung in Anlehnung an Kügler et al., 2013.

Eluierte Phagen weisen auch nach erfolgter Selektion dank ihrer Robustheit infektiöse Eigenschaften auf, sodass mit ihnen frisch amplifizierte *E. coli* Bakterien erneut infiziert werden können (Qi et al., 2012; Smith und Petrenko, 1997). Diese dienen dann entweder als Ausgangsmaterial für eine sich anschließende „panning“-Runde oder zur initialen Charakterisierung einzelner Klone, z.B. mittels Phagen-ELISA. Zur Anreicherung spezifischer Binder werden in der Regel zwei bis fünf „panning“-Runden wiederholt (Sergeeva et al., 2006).

### 1.3.5 Optionen der Präsentation des Selektionsantigens

Im Rahmen des „panning“-Prozesses werden die AK-präsentierenden Phagenpartikel auf dem entsprechenden Zielantigen inkubiert. Hierbei kann zwischen mehreren etablierten Arten der Antigenpräsentation unterschieden werden. Eine Methode beinhaltet die Variante auf reinem, aufgereinigtem Antigen zu selektionieren, dessen Proteinsequenz zuvor bekannt ist (Gur et al., 2009). Antigene können auf Plastikoberflächen (z.B. Polyvinylchlorid), magnetischen Beads oder anderen Oberflächen adsorptiv oder chemisch immobilisiert („gecoatet“) sein (Watkins und Ouwehand, 2000). Neben dem Vorteil auf reinem Antigen selektionieren zu können und somit keine irrelevanten Binder zu isolieren, muss stets eine potentielle Konformationsänderung des Antigens im Rahmen des Aufreinigungsprozesses bedacht werden. Dadurch könnten AK isoliert werden, die das denaturierte Antigen statt dem Membran-gebundenen, ursprünglichen Antigen erkennen (Ruan et al., 2006).

Um diese Fehlerquelle auszuschalten, kann auf biotinylierten Antigenen in Lösung, in Form von ganzen Zellen oder funktionalen Membranfragmenten, gegen ein bekanntes oder unbekanntes Antigen selektioniert werden. Durch die Präsentation in Lösung entfällt hier der Schritt der Immobilisierung. Dies ist durch Nutzung des Biotin-Streptavidin-Systems möglich. Die hochaffine Bindung zwischen beiden Molekülen wird neben der Nutzung einer Selektion in Lösung darüber hinaus für verschiedenste Verfahren in der Immunologie genutzt (Ternynck und Avrameas, 1990). Die biotinylierten Antigene werden mit Phagen auf einer Streptavidin beschichteten Oberfläche inkubiert und somit indirekt selektioniert (Hawkins et al., 1992; Lu und Sloan, 1999). Auch bei dieser optimierten Variante konnte gezeigt werden, dass das Entfernen von (Tumor-)Zellen aus ihrer nativen Umgebung sich negativ auf die Genexpression auswirken kann (Watkins und Ouwehand, 2000). Ebenso kann eine Heterogenität des Gewebes, also ein Nebeneinander von maligne entarteten Tumorzellen und gesunden Zellen, den Erfolg des Selektionsprozesses minimieren (Sanchez-Martin et al., 2015). Um Tumorzellen in ihrem natürlichen Gewebsverbund möglichst homogen den scFv-präsentierenden Phagen als Antigen zugänglich zu machen, wurde eine Methode auf Gefrierschnitten etabliert, die Tumorzellen vom restlichen Gewebe mittels „laser capture microdissection“ (LCM) isoliert (Sun et al., 2009). Doch auch dieses Verfahren zeigte eine nur schwer zu beherrschende Fehlerquelle: die Lasernutzung beeinflusste die

Infektiosität der Phagen und somit auch indirekt den „panning“-Erfolg negativ (Sanchez-Martin et al., 2015).

Um eine hocheffektive Selektion durchzuführen und alle zuvor beschriebenen Problematiken auszuschalten, wurde in unserer Arbeitsgruppe von Haaf *et al.* ein neues Prinzip im Rahmen des „panning“-Prozesses etabliert: Die On-Slide Selektion, eine Depletion und Selektion direkt auf Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten (FPPE) Gewebeschnitten und ohne Verwendung von LCM (Haaf et al, 2015; Fries, 2017).

Zwar gelang eine Selektion mit (FFPE) Gewebeschnitten schon zuvor, beispielsweise Jarutat und Kollegen im Jahr 2009. Hier wurde aber lediglich FFPE-Gewebe in Lösung verwendet und der „panning“-Prozess nicht direkt auf dem Gewebeschnitt durchgeführt (Jarutat et al., 2007).

## 1.4 Zielsetzung

Trotz einer Vielzahl an Optionen und Strategien im Rahmen der AML-Therapie (1.1.4), stellt die AML auch weiterhin eine oftmals letal verlaufende Erkrankung dar. Vor allem da die überwiegende Anzahl der Patienten ein Alter  $\geq 60$  aufweist (medianes Erkrankungsalter von 65 Jahren (Kouchkovsky und Abdul-Hay, 2016)), sind hier häufig Komorbiditäten und niedrigere Therapiefähigkeit der Patienten von Relevanz. Nicht selten ergeben sich hierdurch Kontraindikationen für eine intensive Chemotherapie, sodass das Erreichen einer Kuration maximal erschwert ist. Entscheidet man sich dennoch für eine intensive Behandlung in dieser Altersgruppe, so liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei lediglich ca. 15 % (Krug et al., 2011). Zusätzlich bestehen hohe Rezidivraten von über zwei Drittel der Erkrankten aller Altersgruppen (Campana und Pui, 1995).

Betrachtet man diese gravierende Rezidivquote und das schlechte Gesamtüberleben nach intensiver Chemotherapie in der Altersgruppe der über 65-jährigen, zeigt dies den hohen Bedarf einer Weiterentwicklung der zielgerichteten, weniger toxischen Therapien (1.1.4). Gerade in der Postremissions- und Rezidivtherapie zur Zerstörung der minimalen Resterkrankung ist die Etablierung einer Alternative zur Chemotherapie notwendig (Gasiorowski et al., 2014).

Besonders Fortschritte der Immuntherapie machen den Einsatz von monoklonalen Antikörpern mit hoher Spezifität und niedrigerer Toxizität im Rahmen der zielgerichteten Therapie attraktiv. Als Beispiel sei der zielgerichtete Therapieansatz mit Tyrosinkinaseinhibitoren (z.B. Imatinib, Glivec®) im Rahmen der CML-Therapie genannt. Durch die Inhibition der mutierten Tyrosinkinase ABL (1.1.1) konnte eine 5-Jahres-Überlebensrate von ca. 89 % der Erkrankten registriert werden (Hochhaus et al., 2007). Dies demonstriert eindeutig den potentiellen Erfolg und die niedrige Toxizität einer zielgerichteten Immuntherapie.

Da aktuell kein monoklonaler Antikörper in der Therapie der AML mit Zulassung innerhalb der Europäischen Union existiert (1.1.4), scheint dies ein Forschungsansatz von besonderem Interesse zu sein.

Ziel dieser Arbeit ist es, aus einer Antikörpergenbibliothek mit einer Größe  $\geq 10^8$  AML M2-relevante AK-Fragmente zu isolieren und somit AK für eine mögliche Immuntherapie zu generieren. Dies soll mit Hilfe der Phage-Display-Technologie, die

eine etablierte und einfache Methode zur Generierung rekombinanter AK darstellt (1.3), erreicht werden. Der Selektionsprozess wird auf FFPE-Gewebe eines AML-Patienten durchgeführt. Neben den logistischen Vorteilen einer einfachen Verfügbarkeit und der Handhabung während der Selektion, stellt die On-Slide Selektion eine neue Option, auf nativen Antigenen in ihrem physiologischen Gewebeverbund zu selektionieren, dar (1.3.5). Durch die Selektion direkt auf Patientenmaterial erhofft man sich neben spezifischen, auch klinisch relevante AK für diagnostische und therapeutische Zwecke zu generieren.

Im Anschluss soll mittels ELISA und Sequenzierungsschritten eine Identifizierung und Charakterisierung einzelner Klone auf Phagen-Ebene stattfinden. Eine Analyse der Bindeaffinität und Kreuzreaktivität auf ausgewählten Zelllinien und Geweben, im Rahmen eines eventuellen diagnostischen Einsatzes, wird anschließend mit Hilfe unterschiedlicher AK-Formate, lösliche Einzelketten-AK (scFv-Fc Fusionsproteine) und Fab-Fragmente, durchgeführt.

## 2. Material

### 2.1 Geräte und Software

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
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-Geräte	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
Sequenzer	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
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	Anwendungszweck	Hersteller
GelAnalyzer2010	Proteingehaltbestimmungen	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
Sequencing Analysis 5.3.1	Sequenzanalysen	Life Technologies
XFluor	ELISA	Tecan

## 2.2 Verbrauchsmittel und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnr.
2 x YT Medium	Becton Dickinson	244020
6 x Ladepuffer	Thermo Scientific	# R0631
8-Kammer Zellkulturobjektträger	BD Falcon	354118
10 x Roti-Block	Carl Roth GmbH	A151.2
Agarose	Biozym	850070
Big Dye Mix	Life Technologies	4337455
Big Dye Puffer	Life Technologies	4337455
Blotting Filterpapier	Merck Millipore	IBFP0785C
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich	A7906-100G
DAB (Metal Enhanced)	Life Technologies	34065



DAPI	Vector Laboratories	H-1200
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem	A3672,0100
dNTP Mix	GE Life Science	28-4065-57
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	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	Life Technologies	10270-106
FuGENE HD	Promega	E2311
Transfektionsreagenz		
GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder	Thermo Scientific	SM1331
GeneRuler Low Range DNA Ladder	Thermo Scientific	SM1193
Glucose	Sigma-Aldrich	1001052985
Glycerol	Carl Roth GmbH	7530.1
Hämotoxylin (Harris Modified)	Life Technologies	36000
Helferphage M13K07	New England Biolabs	N0315S
Heparin-Blut Röhrchen	Sarstedt	01.1604
Hi-Di Formamid	Life Technologies	4311320
Hyperphage M13K07 $\Delta$ pIII	PROGEN Biotechnik GmbH	PRHYPE-XS
IHC Universalblockpuffer	Thermo Scientific	36000
Immunoplatte (Nunc Maxisorb)	Thermo Scientific	442404
IPTG	Carl Roth GmbH	2316.4
Lymphoprep Reagenz	Axis-Shield	1114544
Magic Marker XP	Thermo Scientific	LC5602
Mercaptoethanol	Sigma Aldrich	M3148-25ML
Methanol	Sigma Aldrich	32213-1.5L
Milchpulver	Carl Roth GmbH	T145.1
MgCl <sub>2</sub>	Life Technologies	4311820
Ni-NTA Superflow Säulen	Qiagen	30721

NuPAGE 4 - 12 % Bis-Tris Gradientengele	Life Technologies	NP0323
Paraformaldehyd (PFA)	Affymetrix	19943 1LT
PCR-Puffer (10 x)	Life Technologies	4311820
Peroxidase Suppressor	Thermo Scientific	36000
Polyethylenglycol 6.000	Carl Roth GmbH	0158.4
Polyoxyethylensorbitan Monolaurat (Tween 20)	Sigma-Aldrich	P-1379
Ponceau-Lösung	Sigma-Aldrich	P7170-1L
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-1640 Medium	Life Technologies	61870-044
Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder	Thermo Scientific	26634
Sterifilter 0,22 µl; 0,45 µl	Merck Millipore	SLGV033RS; SLHV033RS
Streptavidin-PE	BioLegend	405203
Tetramethylbenzidin (TMB)	Thermo Scientific	34028
Tomlinson Antikörperbibliothek J	Medical Research Council, Centre for Protein Engineering, Cambridge	
Triethylamin (TEA)	Sigma-Aldrich	T0886-500ML
Triton-X-100	AppliChem	A1388,0500
Trypanblau	Life Technologies	15250-061
Vakuumfiltration	TPP	99500
Vivaspin Turbo 15	Sartorius	VS15T21
Waymouth-Medium	Life Technologies	31220-023
Xylol	SAV LIQUID Production GmbH	XTR-5000-97-1

### 2.3 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 <sub>2</sub> , 0,1

	mM ZnCl <sub>2</sub> , pH 6,0
Blocking Solution	1 x Roti-Block
Blotpuffer	70 % ddH <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> O
Elutionspuffer	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8,0
Equilibrierungspuffer	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0
FACS Waschpuffer	1 x PBS, 0,2 % BSA, 0,1 % NaN <sub>3</sub>
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)
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 <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 17,6 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 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 <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,85 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Restriktionsverdau Puffer (NEBuffer 4)	50 mM KCH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> , 20 mM Tris-Acetat, 10 mM Mg(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> , 1 mM DTT
Resuspendierungspuffer	50 mM Tris-HCl, pH 7,4
T4 DNA Ligasepuffer	50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 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 <sub>2</sub> O
TBS (20 x)	18 g Tris-Base, 137 g HCl, 175,6 g NaCl, ad 1 L ddH <sub>2</sub> O
TBST	1 x TBS, 0,1 % Tween 20
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0
Towbin (20 x)	1,92 M Glycin, 250 mg SDS, 0,25 M Tris
Tris-HCl (1 M)	157,6 g, ad 1 L ddH <sub>2</sub> O
Tris-Puffer (20 x)	18 g Tris-Base, 137 g Tris-HCl, 175,6 g NaCl, ad 1 L ddH <sub>2</sub> O

Waschpuffer	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> 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

## 2.4 Medien

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

Zur Herstellung aller zuvor aufgelisteten Puffer, Lösungen sowie Medien wurde ddH<sub>2</sub>O verwendet. Um sterile Verhältnisse zu erreichen, wurden diese - falls nötig - filtriert (Sterifilter, Porengröße 0,22 µl) oder autoklaviert (20 min, 121 °C).

## 2.5 Enzyme

Bezeichnung	Erkennungssequenz	Hersteller	Bestellnr.
Antarktische Phosphatase	-	New England Biolabs	M0289S
<i>AscI</i>	GGCGCGCC	New England Biolabs	R0558S
<i>DpnI</i>	Gm <sup>6</sup> ATC	Thermo Scientific	#ER1705
<i>HindIII-HF</i>	AAGCTT	New England Biolabs	R3104S
<i>NotI-HF</i>	GCGGCCGC	New England Biolabs	R3189S
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	-	Thermo Scientific	#EP0501
Proteinase K	-	Leica	AR9551
<i>SacI-HF</i>	GAGCTC	New England Biolabs	R3156S
<i>SfiI</i>	GGCCNNNNNGGC C	New England Biolabs	R0123S
T4 DNA Ligase	-	New England Biolabs	M0202S
<i>Taq</i> DNA Polymerase (AmpliTaq Gold LD)	-	Life Technologies	4311820
<i>XbaI</i>	TCTAGA	New England Biolabs	R0145S
<i>XhoI</i>	CTCGAG	New England Biolabs	R0146S

## 2.6 Antibiotika

Bezeichnung	Stocklösung	Konzentration	Hersteller	Bestellnr.
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 Streptomycin	1 % in Kulturmedium	Life Technologies	15140-122
Zeocin	100 mg/ml	100 µg/ml	Life Technologies	R25001

## 2.7 Antikörper

Bezeichnung	Wirt	Anwendung	Hersteller	Bestellnr.
Anti-CD34	Monoklonal Maus	Immunfluoreszenz, 1:100	Leica	NCL-L-END
Anti-Human	Monoklonal Maus	Immunfluoreszenz,	Dako	M725401-

CD3		1:50		2
Anti-Human CD20 cy	Monoklonal Maus	Immunfluoreszenz, 1:400	Dako	M075501- 2
Anti-Human CD61	Monoklonal Maus	Immunfluoreszenz, 1:100	Dako	C728001
Anti-Human CD68	Monoklonal Maus	Immunfluoreszenz, 1:100	Dako	M087601- 2
Anti-Human Glycophorin C	Monoklonal Maus	Immunfluoreszenz, 1:100	Dako	M082001- 2
Anti-Human IgG (H+L) F(ab') <sub>2</sub> HRP	Polyklonal Ziege	Western Blot, 1:100000	Merck Millipore	AQ112P
Anti-Human IgG (Fab') <sub>2</sub> Biotin	Polyklonal Maus	Durchflusszytometrie, 0,3 µg Immunhistochemie, 1,5 µg	Jackson Immuno Research	209-065- 097
Anti-M13	Monoklonal Maus	Durchflusszytometrie, 1:5000	GE Healthcare	27-9420- 01
Anti-M13 HRP	Monoklonal Maus	ELISA, 1:5000	GE Healthcare	27-9421- 01
Anti-Maus IgG/IgM FITC	Polyklonal Ziege	Durchflusszytometrie, 1 µg	BD Bio- sciences	555988
Anti-Maus IgG (H+L) HRP	Polyklonal Kaninchen	ELISA, 1:25000	Antibodies -online	ABIN101 782
Anti-Maus- HRP	Polyklonal Kaninchen	Western Blot, 1:5000	Dako	P0260

## 2.8 Reaktionskits

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnr.
ABC Ultra Sensitive Staining Kit	Thermo Scientific	32050
DyEx 2.0 Spin Kit	Qiagen	63206
JetQuick Gel Extraktionskit	Genomed	41-0050
PCR Purification Kit	Qiagen	28106
Plasmid Mini Kit	Qiagen	12125
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen	27106

## 2.9 Bakterienstämme

Bezeichnung	Genotyp	Herkunft	Bestellnr.
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>fhuA2 [lon] ompT gal (λ</i> <i>DE3) [dcm] ΔhsdS λ DE3 =</i> <i>λ sBamHI ΔEcoRI-B</i> <i>int::(lacI::PlacUV5::T7</i> <i>gene1) i21 Δnin5</i>	New England BioLabs	C2527 H
<i>E. coli</i> TG1	<i>F'[traD36 lacIq Δ(lacZ)</i> <i>M15 proA+B+] glnV</i> <i>(supE) thi-1 Δ(mcrB-</i> <i>hsdSM)5 (rK- mK- McrB-)</i> <i>thi Δ(lac-proAB)</i>	Zymo Research	E4109 S
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1</i> <i>hsdR17 supE44 relA1 lac</i> <i>[F' proAB lacIqZΔM15</i> <i>Tn10 (Tetr)]</i>	Agilent Technologies	200249

## 2.10 Zelllinien

Bezeichnung	Ursprungsgewebe	Herkunft
HEK 293T	Humane embryonale Nierenzellen	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), ACC 635
Kasumi-1	Akute myeloische Leukämie	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), ACC 220
NALM-6	Akute lymphathische Leukämie	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), ACC 128

### 2.11 Patientenmaterial

Das zur Durchführung der vorliegenden Arbeit eingesetzte Patientengewebe lag bereits diagnostiziert im Archiv der Pathologie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg (UKGM) vor. Dabei wurde zur Selektion spezifischer Antikörper gegen AML M2 FFPE-Gewebe eines Patienten als Antigen genutzt (n=1). In sich anschließenden Analysen zur Charakterisierung der Bindeaktivität und Kreuzreaktivität der selektionierten Klone wurden FFPE-Gewebe von unterschiedlichen an AML erkrankten Patienten (n=5), sowie FFPE-Schnitte diverser gesunder Organsysteme verschiedener Patienten (n=4) getestet. Das in den durchflusszytometrischen Analysen untersuchte Blut von AML-Patienten (n=3) wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Wolfgang Blau des UKGM zur Verfügung gestellt.

(Genehmigung der Ethikkommission der Justus-Liebig-Universität: Antrag 68/13 + Erweiterungsantrag vom 13.02.2014)

### 2.12 Vektoren

Bezeichnung	Inhalt	Anwendung	Ursprung
pGAL	V <sub>L</sub> - und V <sub>H</sub> -Kette	Umwandlung scFv- in Fab-Fragmente	Abgeleitet aus pComp3 (Barbas et al., 2004)
pIT2	scFv-Gensequenzen	Herstellung scFv-präsentierender Phagenpartikel	Vektor der Tomlinson-Bibliotheken (Nissim et al., 1994)
pMS2	scFv-Gensequenzen	Herstellung scFv-Fc Fusionsproteine mittels eukaryotischer Expression	Abgeleitet aus pSVK3, (Moriya, 1993)
pMT2	V <sub>L</sub> - und V <sub>H</sub> -Kette	Herstellung Fab-Fragmente mittels prokaryotischer Expression	Abgeleitet aus pET27b Vektor von Novagen, (Fitting, 2012)



### 3. Methoden

#### 3.1 Phage-Display-Methoden

##### 3.1.1 Herstellung scFv-präsentierender Phagenpartikel

Zur Herstellung der scFv-präsentierenden Phagen wurde ein Aliquot (500 µl) der bei -80 °C kryokonservierten Tomlinson-Antikörperbibliothek J in 2 x YT<sub>Amp/Gluc</sub>-Medium aufgenommen. Für die zweite und dritte Selektionsrunde dienten kryokonservierte Produkte (ebenfalls bei -80 °C) der vorherigen Selektionsrunde als Ausgangsmaterial. Die Anzucht der TG1 *E. coli* Bakterien der Bibliothek erfolgte mittels Übernachtkultur-Kultur bei 37 °C und Schütteln (220 rpm).

Gleichzeitig erfolgte die Kultivierung frischer TG1s auf M9 Minimalmedium Agarplatten in einer weiteren ÜN-Kultur bei 37 °C. Bis zur Benutzung wurden sie mit Parafilm umwickelt bei 4 °C eingelagert.

Ca. 250 µl der über Nacht angewachsenen AK-Bibliothek wurden zu 10 ml 2 x YT<sub>Amp/Gluc</sub>-Medium bis zu einer optischen Dichte (OD) zwischen 0,08 und 0,1 pipettiert. Eine anschließende Inkubation erfolgte bei 37 °C und 220 rpm bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,4-0,5. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich die *E. coli* Bakterien in der exponentiellen Wachstumsphase (log-Phase) ihrer Wachstumskurve, in der sie einen F-Pilus ausbildeten über den die anschließende Infektion mit den zugegebenen Helferphagen erfolgte. Zum Erhalt der Pili wurde die Kultur bis zur weiteren Nutzung auf Eis gelagert. In Selektionsrunde eins wurden 10 µl M13K07ΔpIII-Hyperphagen, in der zweiten und dritten Runde 100 µl M13K07-Helferphagen eingesetzt (1.3.3). Die anschließende Inkubation erforderte erneut eine Temperatur von 37 °C und erfolgte 30 min stationär und 30 min mit Schütteln bei 250 rpm. Zur Infektionskontrolle wurden 50 µl der mit den Phagen infizierten Bibliothek auf einer 2 x YT<sub>Amp/Kan</sub>-Agarplatte ausplattiert, über Nacht bei 37° C inkubiert und am darauffolgenden Tag auf dichten Bewuchs kontrolliert.

Die restlichen 4,95 ml der infizierten Bibliothek wurden nun anschließend für 5 min bei 4 °C und 4500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 25 ml 2 x YT<sub>Amp/Kan/IPTG</sub>-Medium resuspendiert. IPTG ermöglicht durch Inhibition des lac-Repressors eine Freigabe des lac-Operons, dadurch eine Antikörpertranskription durch die Bakterien und eine Expression der AK an der Phagenoberfläche (1.3.2, Abbildung 2). Ebenso gewährleistete die Zugabe von Ampicillin, dass ausschließlich

Bakterien heranwachsen, die das Phagemid der AK-Bibliothek trugen, das unter anderem für eine Ampicillin-Resistenz codiert. Die Zugabe des weiteren Antibiotikums Kanamycin erlaubte außerdem ausschließlich die Produktion von Bakterien, die erfolgreich von einem Phagen infiziert worden sind, da auf dem Genom des Helferphagen die genetische Information der Kanamycin-Resistenz codiert ist (Barbas et al., 2004). Die Inkubation erfolgte ÜN für 18-20 h bei 250 rpm und 30 °C.

Die ÜN-Kultur wurde zunächst bei 4 °C und 4500 g für 30 min zentrifugiert. Zu dem Phagen enthaltenden Überstand (Phagensuspension) wurden zur Fällung 1/5 des Volumens eiskaltes PEG/NaCl (20 % PEG 6000, 2,5 M NaCl) zugegeben und für 60 min auf Eis gestellt. Dazu machte man sich die hohe Plastikaffinität der Phagen zu Nutze, die anhand dieser Eigenschaft an das PEG banden (Qiang et al. 2017). Durch Zentrifugation bei 4 °C und 15000 g für 30 min und das anschließende Verwerfen des Überstands entstand das Phagenpräzipitat, das in 250 µl PBS aufgenommen wurde. Um noch vorhandene Bakterien aus dem Phagenpräzipitat zu entfernen, wurde dies erneut bei 4 °C und 13000 g für 2 min zentrifugiert und der Phagen-enthaltende Überstand abgenommen. Bis zum Gebrauch am darauffolgenden Tag erfolgte die Aufbewahrung der Suspension bei 4 °C.

### 3.1.2 Spezifische Vorbehandlung der Gewebeschnitte

Entscheidend für den Selektionserfolg bei der Verwendung von FFPE-Gewebe als Ausgangsmaterial ist die Zugänglichkeit der Oberflächenantigene. Diese könnten durch die Formalinfixierung und Einbettung in Paraffin maskiert und daher für die AK als Zielstruktur nicht erreichbar sein. Aufgrund dessen wurden die Schnitte zunächst entparaffiniert und die Antigene durch verschiedene Epitopfreilegungsmethoden demaskiert.

Die Entparaffinierung der Gewebeschnitte (Knochenmarkstanzen eines AML-Patienten, n=1) erfolgte in einem Xylol-Bad und einer absteigenden Ethanol-Reihe beginnend mit 100 % bis hin zu 70 % Ethanol. Da nicht bekannt war welche Vorbehandlung die Epitope der Gewebeschnitte optimal demaskieren würde, wurden verschiedene proteolytische (PIER – „proteolytic induced epitop retrieval“) und hitzeinduzierte (HIER – „heat-induced epitop retrieval“) Vorbehandlungen für FFPE-Schnitte durchgeführt: Enzymatische Vorbehandlung mit Proteinase K und Vorbehandlungen mit Citrat- (pH 6,0) und EDTA-Puffer (pH 8,0). Das Verfahren für die hitzeinduzierte Vorbehandlung beinhaltete das Ansetzen der Lösungen, das kurze Aufkochen der

Schnitte in den Puffern und die anschließende Demaskierung bei 2 x 7 min bei ca. 160 W. Die enzymatische Vorbehandlung erfolgte bei 37 °C für 10 min.

Da auch die Option bestand, dass eine bestmögliche Antigendemaskierung lediglich mit Entparaffinierung ohne weitere Vorbehandlung erzielt werden konnte, wurde je ein Schnitt für Depletion und Selektion ausschließlich entparaffiniert.

### 3.1.3 Depletion und Selektion der scFv-Fragmente

Die zuvor hergestellte Phagensuspension wurde 1:2 in 4 % MPBS für 2 h auf einem Überkopfschüttler für Eppendorfgefäße, zur Vorbeugung von späteren unspezifischen Bindungen, inkubiert. Für die Depletion wurden die vorbehandelten FFPE-Schnitte von morphologisch normentsprechendem Knochenmarkstanzen verwendet und mit 100 µl Phagensuspension bedeckt. Um die Phagen gezielt auf das Gewebe auftragen zu können und eine dauerhafte Benetzung der Oberfläche zu gewährleisten, wurde das Gewebe auf dem Objektträger mit einem Fettstift umkreist. Ziel der einstündigen Depletion war es, alle scFv-Fragmente mit Bindungsaktivität zu dem gesunden Gewebe zu entfernen. Die Phagen, die nach einstündiger Inkubation nicht gebunden hatten, wurden abgenommen und auf die ebenfalls vorbehandelten AML-Knochenmarkstanzen für die Selektion überführt. Die Inkubationszeit betrug auch hier eine Stunde. Durch intensives Waschen im Anschluss sollten alle nicht gebundenen Phagenpartikel entfernt werden. Die Waschstringenz wurde hierbei von Selektionsrunde zu Selektionsrunde erhöht, um so hochaffinere Antikörper zu selektionieren.

Die Waschschritte erfolgten nach folgendem Protokoll:

**Tabelle 3: Waschprotokolle der jeweiligen Selektionsrunde**

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

Zur Elution der spezifisch gebundenen Phagen wurden die Schnitte 10 min mit 100 µl 0,1 M Triethylamin (TEA) Puffer (pH 12,2) inkubiert. Die eluierten Phagen

wurden abgenommen und anschließend zur Neutralisation des pH-Werts zu 100 µl 1 M Tris HCl geben. Zuvor wurden TG1s in 22,5 ml 2 x YT-Medium bei 37 °C und 220 rpm bis zu einer  $OD_{600nm} = 0,4-0,5$  inkubiert. Je 100 µl der frischen TG1s wurden auf das Selektionsgewebe gegeben, um noch nicht eluierte Phagen aufzunehmen. Die Phagenelution wurde zu 15 ml TG1s gegeben und - sowie die mit TG1s bedeckten Objektträger - für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden beide Ansätze zusammengeführt und bei RT und 4500 g für 5 min zentrifugiert. Sobald der Überstand verworfen wurde, wurde das phageninfizierte Bakterienpellet in 200 µl 2 x YT-Medium resuspendiert und auf einer großen 2 x  $YT_{Amp/Glu}$ -Platte ausplattiert. Diese wurde ÜN bei 37 °C inkubiert. Woraufhin am nächsten Tag die Abnahme der gewachsenen Kolonien mit 1,5 ml Einfriermedium (2 x  $YT_{Amp/Glu}$ -Medium mit 15 % Glycerol) in ein Kryoröhrchen erfolgte, was sofort bei -80 °C eingelagert wurde. Das damit erzielte Selektionsprodukt wurde als Ausgangsmaterial für die sich anschließende Selektionsrunde eingesetzt.

#### 3.1.4 Input- und Output-Titer-Bestimmungen der Phagensuspension

Um den Selektionserfolg abschätzen zu können, wurde der Phagentiter vor und nach jeder Selektion bestimmt. Dabei stellte der Input-Titer die Anzahl der hergestellten infektiösen Phagenpartikel, mit denen Selektion und Depletion durchgeführt wurden, dar. Dieser sollte von Runde zu Runde auf gleichbleibend hohem Niveau zwischen  $10^{11}$  und  $10^{13}$  stagnieren (Christ, 2010).

Der Output-Titer beschrieb die Anzahl der selektierten Phagen. Als Zeichen eines korrekten „pannings“ musste der Output-Titer stets niedriger sein als der Input-Titer und zwischen  $10^7$  und  $10^9$ , im besten Falle von Runde zu Runde ansteigend, liegen. Zur Bestimmung der Titer wurde nach der Phagenfällung (für Input-Titer) und nach Phagenelution der Selektion (Output-Titer) eine Verdünnungsreihe von  $10^{-2}$  bis  $10^{-8}$  der Phagensuspension mit PBS hergestellt. Je 200 µl der Verdünnungsreihe wurden mit 800 µl TG1s für 37 °C 30 min stationär und weitere 30 min unter Schütteln bei 250 rpm inkubiert. 10 µl der infizierten Kulturen wurden auf 2 x  $YT_{Amp/Glu}$ -Platten ausplattiert. Nach 12-16 h Inkubation bei 37 °C erfolgte eine Zählung der herangewachsenen Kolonien. Die Berechnung der Titer erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Titer} \left[ \frac{\text{cfu}}{\text{ml}} \right] = \frac{\text{Bakterienzahl} \times 5}{\text{Verdünnung} \times \text{Volumen}}$$

**Formel 1: Titerberechnung**

Bakterienzahl: Anzahl der gewachsenen Kolonien, Verdünnung: Verdünnungsfaktor der Phagensuspension, Volumen: Ausplattiertes Volumen der Verdünnungsreihe

### 3.2 Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA)

#### 3.2.1 Polyklonaler ELISA

Zur Überprüfung der Anreicherung von spezifisch AML-bindenden scFv-Fragmenten diente ein polyklonaler Phagen-ELISA.

Hierfür wurde von den kryokonservierten Produkten der ersten bis dritten Selektionsrunde, sowie von der ursprünglichen Tomlinson-Antikörperbibliothek J, etwas abgekratzt und über Nacht in jeweils 5 ml 2 x YT<sub>Amp/Glu</sub>-Medium bei 220 rpm und 37 °C inkubiert.

Die weitere Herstellung der scFv-präsentierenden Phagen sowie deren Fällung, erfolgte gemäß den Protokollen der Selektionsrunden (3.1.1), sodass vier Phagensuspensionen, drei von jeder Selektionsrunde und einer der original Tomlinson-AK-Bibliothek, fertiggestellt wurden.

Für den eigentlichen ELISA wurde am Tag zuvor eine Immuno-Mikrotiterplatte (96-Well-Platte) mit entsprechenden Antigenen beschichtet. Als Positivantigen dienten Membranfragmente (3.4.6) der humanen AML-Zelllinie Kasumi-1 (1:5 verdünnt in PBS), als Negativantigene wurde sowohl BSA (5 µg/Well) als auch der Plastikboden der Mikrotiterplatte verwendet. Für die benötigte Positivkontrolle wurde Anti-CD30 Ki-4 scFv (0,2 µg/Well) eingesetzt (Klimka et al., 1999). Für alle benötigten Nachweise wurden 100 µl pro Well als Dubletten ausplattiert. Zur adsorptiven Bindung der Antigene an den Boden der Wells wurde die Platte ÜN bei 4 °C eingelagert.

Um später vergleichbare Absorptionswerte zu erhalten, wurden die Phagentiter aller vier Phagenpräzipitate erstellt und berechnet (3.1.4) und die Konzentrationen bei großen Abweichungen normiert. Zur Vorbeugung unspezifischer Bindungen wurden sowohl die 96-Well-Platte (mit 2 % MPBS, 200 µl/Well), als auch die Phagensuspensionen (mit 4 % MPBS) für zwei Stunden inkubiert. Nach Ausklopfen und dreimaligem Waschen der Vertiefungen der Mikrotiterplatte mit PBS, erfolgte die Zugabe des Primäantikörpers in Form von Antikörperfragment-tragenden Phagen. Während der

Inkubation bei RT und 250 rpm für 1 h erfolgte die Herstellung des Enzym-gekoppelten Detektionsantikörpers. Der Anti-M13 HRP wurde mit 2 % MPBS 1:5000 verdünnt und nach abgelaufener Inkubation, vorsichtigem Ausklopfen der Phagen sowie erneutem Waschen mit PBS für eine Stunde in alle Wells pipettiert. Zum endgültigen Proteinnachweis und nach einem letzten Waschschrift wurde TMB als Chromogen verwendet, das nach erfolgter Bindung des Sekundärantikörpers vom gekoppelten HRP aktiviert für eine Blaufärbung sorgte. Nach 5-minütigem Einwirken wurde die enzymatische Reaktion mittels 2 M  $H_2SO_4$  abgestoppt. Es ereignete sich ein Farbumschlag zu Gelb. Die Messung der Absorption eines jeden Wells gelang mit dem ELISA-Reader bei 450 nm. Nach anschließender Subtraktion der Hintergründe erfolgte eine Evaluation der Werte, wobei eine hohe Absorption mit einer vermehrten Bindung der scFv-Fragmente an die ausplattierten Antigene korrelierte.

### 3.2.2 Monoklonaler ELISA

Zum Nachweis und zur Isolierung exklusiver antigenspezifischer rekombinanter Phagen wurde nach dem polyklonalen ein monoklonaler ELISA durchgeführt.

Dazu wurden einzelne Klone der dritten Selektionsrunde isoliert. Dies gelang durch Herstellung einer ÜN-Kultur aus dem kryokonserviertem Produkt der dritten Selektionsrunde (10 ml 2 x  $YT_{Amp/Glu}$ -Medium ÜN bei 37 °C und 220 rpm). Nach Herstellung einer Verdünnungsreihe ( $10^{-2}$  bis  $10^{-8}$ ) der ÜN-Kultur mit 2 x  $YT_{Amp/Glu}$ -Medium wurden 10 µl jeder Verdünnung auf 2x $YT_{Amp/Glu}$ -Agarplatten ausplattiert und bis zum nächsten Tag bei 37 °C kultiviert. Durch Picken der ÜN gewachsenen Klone mit einem Impfstempel in vorbereitete 96-Well-Platten (U-Boden) mit 150 µl 2 x  $YT_{Amp/Glu}$ -Medium, gelang die Isolierung antigenspezifischer Phagen pro Plattenvertiefung. Die Infektion erfolgte abgedeckt erneut ÜN bei 37 °C und 180 rpm.

Für die Durchführung des eigentlichen ELISA wurde in eine zuvor hergestellte Arbeitsplatte (96-Well-Platte, U-Boden, 150 µl 2 x  $YT_{Amp/Glu}$ -Medium/Well) 2 µl aus jedem Well der ersten Platte in das entsprechende der Arbeitsplatte pipettiert, woraufhin sich eine zweistündige Inkubation bei 37 °C und 180 rpm bis zu einer  $OD_{600nm} = 0,4-0,5$  anschloss. Währenddessen erfolgte die Fertigstellung der Masterplatten durch Zugabe von 30 µl 100 % Glycerol pro Well, die bis zum Gebrauch bei -80°C eingelagert wurden.

Für die Infektion der Arbeitsplatte wurde M13K07ΔpIII-Hyperphagen (Stock  $10^{12}/ml$ ) 1:100 in PBS verdünnt und davon 30 µl in jedes Well pipettiert. Die Inkubation erfolgte

30 min stationär und 30 min bei 180 rpm bei 37 °C. Nach der sich anschließenden Zentrifugation bei 1800 g und 4 °C für 10 min wurde der Überstand abgesaugt und das Phagen-enthaltende Pellet mit 200 µl pro Well (2 x YT<sub>Amp/Kann/IPTG</sub>-Medium) resuspendiert. Die Herstellung der scFv-präsentierenden Phagen erfolgte abgedeckt für 18-20 h bei 30 °C und 180 rpm. Ebenfalls am gleichen Tag wurden zwei Immuno-Mikrotiterplatten für den monoklonalen ELISA mit entsprechenden Positiv- und Negativantigenen gecoatet. Die Durchführung des eigentlichen ELISA am Folgetag und erfolgte laut Protokoll des polyklonalen ELISAs (3.2.1). Insgesamt wurden hierbei 88 unterschiedliche Klone auf Kasumi-1 und BSA getestet. Nach Auswertung der Absorptionen durch den ELISA-Reader, wurde anhand des Hintergrunds als Referenz in schwache (10-100 x Hintergrund), mittlere (100-200 x Hintergrund) und starke (> 200 x Hintergrund) Binder unterschieden.

### 3.3 Molekularbiologische Verfahren

#### 3.3.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) stellt ein standardisiertes molekularbiologisches Verfahren zur Amplifikation von DNA dar. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde dieses Verfahren für unterschiedliche Zwecke genutzt:

1. Plasmid-Nachweis in Form einer Kolonie-PCR
2. Sequenzanalyse eines DNA-Abschnittes
3. Ortsgerichtete Mutation einer Base eines Nukleotids
4. Herstellung von Restriktionsschnittstellen für Umklonierungen

Die dafür benötigten Reagenzien wurden zunächst miteinander vermischt und auf einzelne PCR-Gefäße aufgeteilt. Anschließend erfolgte die Zugabe des zu amplifizierenden Templates. Je PCR wurde sowohl eine Positivkontrolle zur Kontrolle der Funktionsfähigkeit der Reaktion, als auch eine Negativkontrolle ohne Template zur Kontaminationskontrolle mitgeführt. Als Positivkontrolle diente DNA eines zuvor bekannten und analysierten Plasmids. Für die Negativkontrolle wurde statt Template ddH<sub>2</sub>O zum Mastermix pipettiert.

Gegebenenfalls erfolgte nach der PCR eine Aufreinigung der PCR-Produkte mittels Qiagen PCR-Purification Kit nach den Angaben des Herstellers (2.8).

Folgende Tabellen zeigen jeweils die Zusammensetzung des Mastermix‘ und die zur Durchführung benötigten Protokolle.

**Tabelle 4: Kolonie-PCR - Ansatz und Durchführung**

Ansatz		Programm		Zyklenanzahl
10x PCR-Puffer	5 µl	Initiale Denaturierung	10 min, 95 °C	1
MgCl <sub>2</sub>	3 µl	Denaturierung	30 s, 95 °C	30
dNTP's	0,5 µl	Annealing	30 s, 55 °C	30
3' Primer	1 µl	Elongation	75 s, 72 °C	30
5' Primer	1 µl	Finale Elongation	10 min, 72 °C	1
Taq-Polymerase	0,25 µl	Kühlung	∞, 4 °C	1
ddH <sub>2</sub> O	38,25 µl			
Template	1 µl Plasmid/ Bakterien- kolonie			

**Tabelle 5: Sequenzierungs-PCR - Ansatz und Durchführung**

Ansatz		Programm		Zyklenanzahl
Big Dye Puffer	2 µl	Initiale Denaturierung	60 s, 96 °C	1
Big Dye Mix	1 µl	Denaturierung	10 s, 96 °C	25
3' - bzw. 5' Primer	1,5 µl	Annealing	5 s, 50 °C	25
ddH <sub>2</sub> O	4,5 µl	Elongation	75 s, 60 °C	25
Template	1 µl	PCR- Produkt bzw. Plasmid	Kühlung ∞, 4 °C	1



**Tabelle 6: PCR im Rahmen der ortsgerichteten Mutagenese - Ansatz und Durchführung**

Ansatz		Programm		Zyklusanzahl
10x PCR-Puffer	5 µl	Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C	1
dNTP's	0,5 µl	Denaturierung	1 min, 95 °C	12
3' Primer	1 µl	Annealing	1 min, 55 °C	12
5' Primer	1 µl	Elongation	5 min, 72 °C	12
Pfu Polymerase	1 µl	Finale Elongation	5 min, 72 °C	1
Template	50 ng	Kühlung	∞, 4 °C	1
ddH <sub>2</sub> O	ad 50 µl			

**Tabelle 7: PCR im Rahmen der Herstellung von Restriktionsschnittstellen - Ansatz und Durchführung**

Ansatz		Programm		Zyklusanzahl
10x PCR-Puffer	5 µl	Initiale Denaturierung	10 min, 95 °C	1
MgCl <sub>2</sub>	3 µl	Denaturierung	30 s, 95 °C	30
dNTP's	0,5 µl	Annealing	30 s, 55 °C	30
3' TL V <sub>H</sub> /V <sub>L</sub>	1 µl	Elongation	30 s, 72 °C	30
5' TL V <sub>H</sub> /V <sub>L</sub>	1 µl	Finale Elongation	10 min, 72 °C	1
Taq-Polymerase	0,25 µl	Kühlung	∞, 4 °C	1
ddH <sub>2</sub> O	38,25 µl			
Template	1 µl			
	Plasmid			

### 3.3.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese stellt ein Verfahren dar, das die Auftrennung von DNA-Fragmenten gemäß ihrer Größe mittels angelegter Spannung erlaubt. Infolgedessen ist mit dieser Methode eine direkte Kontrolle auf regelrechte Herstellung von Produkten nach durchgeführter PCR oder einem Restriktionsverdau möglich.

Zur Herstellung des Agarose-Gels wurde zu 100 ml TAE-Puffer 1,5 % Agarose Pulver und 5 µl 1 % Ethidiumbromidlösung gegeben, dieses in einer Mikrowelle erwärmt und

anschließend in einen Schlitten gegossen. Nach Erhärten des Gels wurde dieses in eine Kammer mit 1 x TAE-Puffer eingelegt und mit den zu überprüfenden PCR-Produkten (Produkt plus 6 x Ladepuffer, der die Proben sowohl beschwerte, als auch die aktuelle Lauffront anzeigte) sowie eines Molekulargewichtsmarkers beladen. Nach einer angelegten Spannung von ca. 130 V für 30 min, konnte die Analyse der Proben erfolgen wobei Ethidiumbromid, das zwischen den Basen der DNA interkaliert, die Darstellung der einzelnen Banden unter UV-Licht ermöglichte.

### 3.3.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Um anschließend die amplifizierten DNA-Fragmente nach erfolgreicher PCR gezielt, das heißt im korrekten Verhältnis einsetzen zu können, musste sich eine Konzentrationsbestimmung des DNA-Gehalts in ng/µl der jeweiligen Probe anschließen. Dies erfolgte photometrisch anhand der Absorption bei 260 nm im UV-Spektrometer. Neben dem DNA-Gehalt gab die Messapparatur gleichzeitig auch die Reinheit der entsprechenden Probe an.

### 3.3.4 Sequenzierung

Zur Überprüfung einer Klonierung, Mutation oder amplifizierter PCR-Produkte ist es mittels Sequenzierung möglich, die genaue Basenabfolge eines DNA-Abschnittes zu analysieren und somit das Resultat einer bestimmten Methode auf deren Erfolg zu überprüfen.

Die Analyse der Sequenzen erfolgte anhand der beiden Einzelstränge der doppelsträngigen DNA. Demnach wurde pro Probe jeweils ein PCR-Ansatz mit 3'- und 5'-Primern angesetzt (3.3.1). Nach erfolgreicher Amplifikation und vor der eigentlichen Sequenzierung, schloss sich die Aufreinigung der PCR-Produkte mit DyEx 2.0 Spin Kit von Qiagen gemäß den Angaben des Herstellers an (2.8). Anschließend wurden 10 µl der aufgereinigten Probe mit 10 µl Formamid vermischt und in die Platte der Sequenzierungsmaschine pipettiert.

Das hier angewandte Sequenzierungsprinzip erfolgte nach der Didesoxymethode nach Sanger. Eine DNA-Polymerase führt eine In-vitro-Replikation durch, bei der aufgrund von ddNTP's mit inkorrektem 3'-OH-Ende die Amplifikation vorzeitig unterbrochen wird und dadurch unterschiedlich lange DNA-Einzelstücke entstehen. Diese tragen am 3'-Ende eine Fluoreszenzmarkierung. Durch einen Laser angeregt werden diese, nach

Auftrennung in einer Kapillarelektrophorese, zur Fluoreszenz angeregt, das entstandene Signal gemessen und in einem Chromatogramm aufgetragen (Sanger et al., 1977).

### 3.3.5 Plasmidpräparation

Zur Isolation und Aufreinigung der rekombinanten Plasmid-DNA wurden QIAprep Spin Miniprep Kit oder Plasmid Mini Kit von Qiagen verwendet (2.8). Das Verfahren beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979). Hierfür wurden Kulturen, mit steriler Pipettenspitze gepickt, von Bakterienkolonien in 5 ml 2 x YT<sub>Amp</sub>-Medium angelegt und ÜN bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Nach erfolgreicher Kultivierung erfolgte die Plasmidpräparation gemäß den Herstellerangaben am Folgetag. Nachdem die Konzentrationsbestimmung des DNA-Gehalts durchgeführt wurde (3.3.3), wurden die fertig isolierten und aufgereinigten Plasmide bei -20 °C eingelagert.

Um Plasmide längerfristig und stabiler aufbewahren zu können, erfolgte parallel zur Plasmidpräparation pro Klon die Anlage eines Bakterienglycerolstocks. Hierzu wurden vor der Plasmidpräparation 425 µl der ÜN-Kultur mit 75 µl sterilem Glycerol in Kryotubes vermischt und diese anschließend bei -80 °C kryokonserviert.

### 3.3.6 Hitzeschocktransformation von *E. coli* Bakterien

Mittels dieses Verfahrens ist es möglich, Fremd-DNA in kompetente *E. coli* Stämme einzubringen, die in vorliegender Arbeit zur prokaryotischen Genexpression der AK-Fragmente dienten. Hierfür wurden scFv-Fragmente in XL-1 Blue und BL21(DE3) transformiert.

Je Transformation wurden 50 µl kompetente *E. coli* Zellen auf Eis aufgetaut und 0,9 µl β-Mercaptoethanol hinzupipettiert. Der Ansatz wurde 10 min, unter zwischenzeitlichem Mischen, auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 0,1-50 ng der zu transformierenden DNA, folgte eine weitere Inkubation auf Eis für 30 min. Die sich nun anschließende Hitzeschocktransformation für genau 45 s im 42 °C warmen Wasserbad erlaubte eine kurzzeitige Öffnung der Membranen der kompetenten Zellen, wodurch die Aufnahme der Fremd-DNA in die Bakterien gelang. Nachdem der Ansatz für 2 min auf Eis wieder heruntergekühlt wurde, erfolgte die Zugabe von 950 µl SOC-Medium pro Ansatz und eine anschließende Inkubation für eine Stunde bei 37 °C und 250 rpm. Das Bakterienpellet, das bei einer Zentrifugation bei 800 g für 5 min entstand, wurde in 100 µl 2 x YT-Medium resuspendiert und 50 µl auf einer zuvor hergestellten Agarplatte

(Selektionsmarker bei XL-1 Blue 100 µg/ml Ampicillin, bei BL21 (DE3) 50 µg/ml Kanamycin) 1:10 und unverdünnt ausplattiert. Die Platten inkubierten anschließend über Nacht bei 37 °C. Zur Kontrolle auf regelrechte Amplifikation und Genexpression wurde von gepickten Klonen eine Kolonie-PCR (3.3.1) mit anschließender Gelelektrophorese (3.3.2) und Sequenzierung (3.3.4) durchgeführt. Parallel erfolgte eine ÜN-Kultur für eine Plasmid-Präparation (3.3.5) der ausgewählten Klone.

### 3.3.7 Restriktionsverdau von DNA-Fragmenten

Mit Hilfe eines Restriktionsverdaus lassen sich DNA-Fragmente gezielt an gewünschten Stellen spalten, sodass eine Isolierung einzelner Abschnitte aus einem DNA-Molekül bzw. Plasmid gelingen kann. Dies wird je nach Fragstellung durch spezifische Restriktionsenzyme, die definierte Basensequenzen erkennen und zerschneiden, erreicht.

Ein Restriktionsverdau kam in vorliegender Arbeit im Rahmen der ortsgerichteten Mutagenese (3.3.8) und bei Umklonierungsschritten (3.3.9) zur Anwendung.

In folgender Tabelle ist der Ansatz eines Restriktionsverdaus dargestellt:

**Tabelle 8: Ansatz eines Restriktionsverdaus**

10x Puffer NEB4	2,5 µl
10x BSA	2,5 µl
Restriktionsenzym 1	1 µl
Restriktionsenzym 2	1 µl
Template	1 µg
ddH <sub>2</sub> O	ad 25 µl

Der Restriktionsverdau erfolgte für eine Stunde und wurde durch eine Hitzeinaktivierung der Enzyme für weitere 20 min beendet. Die zu wählende Temperatur sowohl beim Restriktionsverdau, als auch bei der Hitzeinaktivierung, richtete sich nach dem angegebenen spezifischen Optimum des jeweils verwendeten Enzyms. Wurde mit Hilfe eines Restriktionsverdaus ein Vektor geschnitten, erfolgte zwischen Verdau und Hitzeinaktivierung eine sogenannte Dephosphorylierung, mit der die Phosphatgruppe am 5'-Ende entfernt und somit ein vorzeitiges Schließen des Vektors ohne das

anschließend zu ligierende Insert verhindert wurde. Hierfür wurde 3 µl 10 x Puffer Antarctic, 1 µl Antarctic Phosphatase und ddH<sub>2</sub>O ad 30 µl verwendet.

### 3.3.8 Ortsgerichtete Mutagenese

Für die Produktion löslicher scFv-Fragmente durch non-Suppressorstämme war es notwendig, die vorhandenen Stopcodone innerhalb der Genfragmente zu entfernen. Dies wurde durch eine ortsgerichtete Mutagenese-PCR einer Base eines Nukleotids, nämlich Thymidin zu Cytosin, die das Stopcodon TAG zu CAG ummutierte, erreicht. Dies entsprach der Aminosäure Glutamin.

Zur Amplifikation und Entfernung des Stopcodons wurde eine PCR durchgeführt (3.3.1). Um die anschließende Transformation des nun neu hergestellten Plasmids ohne Stopcodon sicherzustellen, erfolgte ein Restriktionsverdau und somit Zerstörung des ursprünglichen Plasmids. Dafür wurde 1 µl Restriktions-Endonuklease DpnI pro PCR-Ansatz hinzupipettiert, die die nicht erfolgreich mutierte DNA entfernte. Der Reaktionsansatz wurde bei 37 °C für eine Stunde inkubiert.

Im Anschluss erfolgte eine Hitzeschocktransformation (3.3.6). Hierfür wurden 5 µl des verdauten PCR-Produkts und kompetente *E. coli* XL-1 Blue eingesetzt.

Zur Überprüfung des Mutationserfolgs diente eine Kolonie-PCR (3.3.1) der über Nacht gewachsenen Klone mit anschließender Gelelektrophorese (3.3.2) und Sequenzierung (3.3.4). Bei erfolgreicher Mutation wurde von den entsprechenden Klonen eine ÜN-Kultur in 5 ml 2 x YT<sub>Amp</sub>-Medium angelegt. Eine Aufreinigung erfolgte am Folgetag mittels Plasmidpräparation (3.3.5). Nachdem der DNA-Gehalt der Proben bestimmt wurde (3.3.3), erfolgte eine Aufbewahrung bei -20 °C bis zum weiteren Gebrauch.

### 3.3.9 Umklonierung von DNA-Fragmenten

Umklonierungen stellen ein Verfahren dar, mit dem DNA-Abschnitte in andere Vektoren überführt werden können, die für bestimmte Verfahren besser qualifiziert sind. Eine Umklonierung wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit zweimal angewandt:

1. Für die Herstellung löslicher scFv-Fc Fusionsproteine durch eukaryotische Genexpression. Hierbei fand eine Umklonierung der selektierten Plasmide aus dem pIT2-Vektor der Tomlinson-Bibliothek in einen pMS2-Vektor statt.

2. Für die Umwandlung der scFv-Fragmente in Fab-Fragmente. Die Umklonierung der Gensequenzen erfolgte hier aus einem pMS2- in einen pMT2- Expressionsvektor.

Folgende Arbeitsschritte beinhaltet jede durchgeführte Umklonierung:

- Restriktionsverdau (3.3.7)
- Ligation
- Hitzeschocktransformation (3.3.6)

Zu 1.: Der Restriktionsverdau von Insert und Vektor erfolgte an den Schnittstellen *SfiI* und *NotI* (1.3.2) mit entsprechenden Restriktionsenzymen. Zur Kontrolle auf regelrechten Verdau und Extraktion der einzelnen DNA-Abschnitte, schloss sich eine Gelelektrophorese an (3.3.2). Dafür wurde die gewünschte Bande mit einem Skalpell unter UV-Licht separiert und mit Hilfe des JetQuick Gel Extraktionskit gemäß den Angaben des Herstellers aufgereinigt (2.8). Für die sich anschließende Ligation war eine Messung der DNA-Konzentration notwendig (3.3.3). Das Verhältnis der einzelnen Bestandteile für einen Ligationsansatz errechnete sich nach folgender Formel:

$$\text{Insertmenge [ng]} = \frac{\text{Insertgröße [bp]}}{\text{Vektorgröße [bp]}} \times \text{Menge Vektor [ng]}$$

**Formel 2: Berechnung der benötigten Menge des Inserts**

Verhältnis Vektor:Insert 1:10, Größe pMS2-Vektor: 7488 bp, Größe Insert: 733 bp, Menge Vektor: 50 ng

Bevor die Zugabe von 2 µl 10x Ligase Puffer und 1 µl T4-Ligase erfolgte, wurden Insert, Vektor und ddH<sub>2</sub>O gemischt und für 10 min auf Eis gestellt. Die anschließende Ligation fand bei RT für eine Stunde statt. Durch Hitzeinaktivierung bei 65 °C für 10 min wurde die Reaktion abgestoppt. Das ligierte Plasmid konnte nun mittels Hitzeschocktransformation in kompetente *E. coli* Bakterien transformiert werden (3.3.6).

Zu 2.: Die Anlagerung der Restriktionsschnittstellen an V<sub>L</sub> und V<sub>H</sub> der selektionierten scFv's erfolgte mittels PCR (3.3.1). Die eigentliche Umklonierung des Plasmids aus dem pMS2-Vektor in den pMT2-Vektor wurde schrittweise in einzelnen Umklonierungsschritten durchgeführt. Dafür wurden V<sub>L</sub> und V<sub>H</sub> getrennt in einen

Zwischenvektor pGAL ligiert, um anschließend gemeinsam in den endgültigen Vektor pMT2 ligiert zu werden.

**Tabelle 9: Umklonierungsschritte für die Umwandlung von scFv-Fragmenten in Fab-Fragmente in chronologischem Ablauf**

Umklonierung	Restriktionsenzyme	Ligation	Hitzeschock-transformation
V <sub>L</sub> in pGAL	<i>SacI</i> - <i>XbaI</i>	Insert: 354 bp, Vektor: 4274 bp	in XL-1Blue
V <sub>H</sub> in V <sub>L</sub> +pGAL	<i>XhoI</i> - <i>HindIII</i>	Insert: 370 bp, Vektor ~ 4400 bp	in XL-1 Blue
V <sub>L</sub> +V <sub>H</sub> in pMT2	<i>SfiI</i> - <i>AscI</i>	Insert: 1439 bp, Vektor: 5340 bp	in BL21(DE3)

Die Ligation lief synonym der zuvor beschriebenen ab. Um im letzten Schritt V<sub>L</sub> und V<sub>H</sub> in den pMT2 Vektor zu ligieren, wurde dieser vorher selbst verdaut, um sein Insert herauszuschneiden. Hierfür wurden ebenfalls *SfiI* und *AscI* als Restriktionsenzyme genutzt.

Nach jedem Schritt wurde zur Kontrolle auf erfolgreiche Umklonierung von gepickten Klonen eine Kolonie-PCR (3.3.1) mit anschließender Gelelektrophorese (3.3.2) und Sequenzierung (3.3.4) durchgeführt. Parallel erfolgte eine ÜN-Kultur für eine Plasmid-Präparation (3.3.5) der ausgewählten Klone. Das aufgereinigte und isolierte Plasmid diente als Ausgangsprodukt für den jeweils nächsten Umklonierungsschritt.

### 3.3.10 Western-Blot

Mit Hilfe eines Western Blots lassen sich Proteine spezifisch nachweisen sowie Aussagen über ihre molekulare Größe treffen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die fertig hergestellten scFv-Fc Fusionsproteine und Fab-Antikörperfragmente mittels Western Blot beurteilt.

Zunächst erfolgte eine Auftrennung der Proteingemische nach deren Größe mittels Gelelektrophorese für 50 min bei 200 V (3.3.2). Als Marker dienten jeweils 3 µl Color Marker und Magic Marker, die parallel mit den Proben (gemischt mit Sample Puffer im Verhältnis 1:1) entlang der Spannung liefen. Daran schloss sich das eigentliche Blotten in der Blottingapparatur an. Hierbei wurden die aufgetrennten Proteinbanden mittels

waagrecht angelegten Stromflusses (20 min, 500 mA) vom Gel auf eine Trägermembran übertragen.

Eine temporäre Ponceau-Färbung diente zur Proteindetektion, sprich sie zeigte einen erfolgreichen Proteintransfer an. Diese erfolgte mit 20 ml Ponceau-S-Lösung, in der die Membran für 2 min inkubierte. Ein anschließendes Waschen in TBST gab die AK-Bindungsstellen für den folgenden Proteinnachweis wieder frei. Weiterhin sollte ein Blocken der Membran für 1 h mit Blocking-Solution anschließende unspezifische Bindungen verhindern. Zur Immunodetektion dienten als Sekundärantikörper Anti-Mouse-HRP (1:5000 in ddH<sub>2</sub>O und Roti-Block verdünnt) für die scFv-Fc Fusionsproteine und Anti-Human IgG Fab-HRP (1:100000) für die Fab-Fragmente. Die vorherige Zugabe eines zusätzlichen Primärantikörpers entfiel hierbei, da es sich beim zu untersuchenden Proteingemisch bereits um AK handelte, an die der Sekundärantikörper binden konnte. Die endgültige Auswertung gelang durch eine enzymgekoppelte Chemolumineszenzreaktion mit jeweils 500 µl Solution A und B des ECL-Prime pro Membran im anschließenden Entwicklerbad, sodass die Proteinbanden auf Röntgenfilm mittels Autoradiographie sichtbar wurden.

### 3.4 Zellbiologische Verfahren

Die Arbeiten in der Zellkultur erfolgten stets unter sterilen Bedingungen: alle Schritte wurden unter einer sterilen Arbeitsbank durchgeführt und es kamen ausschließlich sterile Medien und Lösungen zur Anwendung.

#### 3.4.1 Kultivierung von Zelllinien

Die Kultivierung aller Zellen erfolgte in RPMI-160 Medium im Brutschrank bei einer Temperatur von 37 °C und unter kontinuierlicher fünfprozentiger CO<sub>2</sub>-Begasung.

Folgende Tabelle gibt einen Überblick über Konditionen der Zellkultivierung und den Verwendungszweck der kultivierten Zelllinien in vorliegender Arbeit.



**Tabelle 10: Kultivierungskonditionen und Verwendungszweck der Zelllinien**

	Kultivierung			Verwendungszweck		
	Wachstums- modus	FBS	P/S	Herstellung scFv-Fc's	Bindungs- analysen	Herstellung MF
<b>HEK 293T</b>	adhärent	10 %	1 %	X		
<b>Kasumi-1</b>	in Suspension	20 %	-		X	X
<b>NALM-6</b>	in Suspension	10 %	1 %		X	

Bei erreichter Maximaldichte innerhalb der Wachstumsphase mussten die Zellen, um weiterhin für eine hohe Proliferationsrate zu sorgen, passagiert werden. Dafür wurde bei den adhärent wachsenden Zellen das verbrauchte Medium vorsichtig abgenommen und 5 ml RPMI-160 Medium frisch hinzu pipettiert. Die gelösten Zellen wurden in ein Falcon überführt und 5 min bei 250 g und RT zentrifugiert. Das dabei entstandene Pellet wurde daraufhin in 10 ml frischem Medium vorsichtig aufgenommen und in eine Kulturflasche überführt. Für die Zellen in Suspension wurde genauso verfahren, mit der Ausnahme, dass ein Ablösen des Zellrasens vom Boden der Kulturfalsche entfiel.

Je nach Dichte des Bewuchses wurde zuvor ein Splitverhältnis zwischen 1:2 und 1:40 festgelegt.

### 3.4.2 Manuelle Zellzählung

Für die Mehrheit der zellbiologischen Verfahren war es notwendig, mit einer genau definierten Anzahl an Zellen zu arbeiten. Dazu konnte die Konzentration [Zellen/ml] mit einer Neubauerkammer ermittelt werden. Hierfür wurden Zellen und Trypanblau-Lösung in einem Verhältnis von 1:1 miteinander vermischt. Trypanblau färbte nur bereits abgestorbene Zellen an und erlaubte daher eine ausschließliche Zählung der vitalen Zellen. Zur Konzentrationsbestimmung wurden alle Zellen in den vier Kammern der Zählkammer ausgezählt und die Zellzahl mit Hilfe folgender Formel errechnet:

$$\text{Zellkonzentration [Zellen/ml]} = \frac{\text{gezählte Anzahl}}{\text{Anzahl der Kammern}} \times \text{Verdünnung} \times \text{Kammervolumen}$$

**Formel 3: Berechnung der Zellkonzentration mit Hilfe der Zählkammer nach Neubauer**

### 3.4.3 Kryokonservierung von kultivierten Zellen

Für einen Zeitpunkt von mehreren Wochen war es möglich, zuvor kultivierte Zellen bei  $-80\text{ °C}$  zu lagern. Wurde ein längerer Konservierungszeitraum gewünscht, wurden die Zellen in Behältnissen mit flüssigem Stickstoff bei ca.  $-196\text{ °C}$  aufbewahrt.

In 1 ml Einfriermedium (RPMI, 50 % FBS, 10 % Dimethylsulfoxid) wurde eine optimale Anzahl an Zellen (nach Angaben der Datenblätter) aufgenommen und in Kryoröhrchen aliquotiert. Zum schonenden Abkühlen bzw. Einfrieren der Zellen ( $1\text{ °C/min}$ ) wurden die Röhrchen in ein Kryo-Einfriergerät gestellt, in dem die Zellen bis zum Folgetag bei  $-80\text{ °C}$  verblieben.

Um kryokonservierte Zellen erneut in Kultur nehmen zu können, wurden diese zunächst bei RT aufgetaut, dann in 5 ml des RPMI-160 Medium gegeben und anschließend mittels Zentrifugation bei 250 g und RT für 5 min vom Einfriermedium befreit. Das Pellet wurde, je nach Größe der Kulturflasche, in 3-12 ml Medium aufgenommen und im Brutschrank unter obengenannten Bedingungen kultiviert (3.4.1).

### 3.4.4 Transfektion der HEK 293T Zellen

Für die Transfektion wurden  $0,2 \times 10^6$  HEK 293T Zellen in 2 ml RPMI Medium mit 10 % FBS und 1 % P/S in jeweils ein Well einer 6-Well-Platte überführt. Die adhären wachsenden Zellen wurden im Brutschrank, bis ein Großteil (ca. 80 %) des Well-Bodens bewachsen war, kultiviert.

Für die eigentliche Transfektion wurde 1  $\mu\text{g}$  DNA mit der 2,5-fachen Menge auf RT erwärmten Transfektionsreagenz Fugene vermischt und auf 100  $\mu\text{l}$  mit RPMI Medium aufgefüllt (einzuhaltende Reihenfolge: Medium + Fugene Inkubation 5 min, dann DNA). Während einer Inkubation von 15 min bildete sich ein Komplex aus DNA und Lipiden des Transfektionsreagenz'. Anschließend wurden 100  $\mu\text{l}$  des Komplex' tröpfchenweise in die vorbereiteten Wells pipettiert und die Platte vorsichtig geschwenkt. Durch Inkubation im Brutschrank wurde der Lipidkomplex mittels Endozytose in das Zytoplasma der HEK-Zellen aufgenommen. Nach 48-stündiger Inkubation wurde 1 ml Kulturüberstand pro Well abgenommen, 5 min bei  $4\text{ °C}$  und 4000 g zur Entfernung von Zellresten zentrifugiert und in ein frisches Röhrchen überführt. Bis zur Analyse der Bindeaktivität der löslichen scFv-Fc Fragmente mittels Durchflusszytometrie (3.5) wurde der Überstand bei  $4\text{ °C}$  eingelagert.

Die übrigen 500  $\mu\text{l}$  der Zellen wurden in 5 ml Zeocin-Medium (RPMI, 10 % FBS, P/S, 100  $\mu\text{g/ml}$  Zeocin) für weitere Kultivierung in Kulturfalschen überführt. Die Antibiose

Zeocin (Pleomycin D1) gewährleistete dabei eine Selektion zwischen Zellen, die erfolgreich mit Plasmid-DNA transfiziert wurden und damit eine Resistenz trugen und denjenigen, die das Plasmid nicht endozytiert haben. Bei zweitgenannten kam es daher zur induzierten Apoptose.

Die Effizienz der Transfektion konnte ebenfalls mittels Durchflusszytometrie kontrolliert werden. Dafür wurden die Zellen mit 1 ml frischem Medium (RPMI, 10 % FBS, P/S) vom Well-Boden gelöst und 5 min bei 2000 g und RT zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Medium (identische Zusammensetzung + 100 µg/ml Zeocin) resuspendiert. Davon wurden 500 µl zur Transfektionskontrolle abgenommen, bei gleichen Einstellungen nochmals zentrifugiert und in 1 ml FACS Waschpuffer aufgenommen. Es schloss sich ein erneuter Zentrifugationsschritt an. Das Pellet wurde daraufhin in 1 % PFA resuspendiert und fixiert. Ein grünes Fluoreszenzsignal wurde mittels Guava EasyCyte 5HT gemessen und ließ Rückschlüsse auf die Effizienz der Transfektion zu.

Nach ca. 14 Tagen Kultivierung unter Zeocinbehandlung wurden die Zellen erneut auf erfolgreiche Transfektion überprüft und anschließend kryokonserviert (3.4.3). Während der zweiwöchigen Kultivierung wurden an Tag 7 und Tag 11 erneut Überstände wie zuvor beschrieben entnommen und bei 4 °C für weitere Analysen eingelagert.

#### 3.4.5 Herstellung von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC's)

In vorliegender Arbeit wurden gesunde PBMC's für diverse Bindungsanalysen als Negativantigen verwendet. Zur Herstellung mittels Dichtegradientenzentrifugation wurde heparinisiertes, humanes Vollblut in einem Verhältnis von 1:1 mit RPMI Medium vermischt. In ein 15 ml Falcon wurde 1/3 Ficoll (Lymphoprep Reagenz) vorgelegt und anschließend vorsichtig mit 2/3 der Blut/RPMI-Mischung aufgefüllt. Ein Zentrifugationsschritt (30 min, 800 g, RT, ohne Bremse) trennte die einzelnen Blutzellen aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichteigenschaften auf. Dabei wurden Erythrozyten und Granulozyten mit höherer Dichte am Boden unterhalb des Plasmas angereichert. Die PBMC's wurden mittels Lymphoprep Reagenz' als Phase zwischen diesen beiden Schichten aufgetrennt. Der PBMC-Ring konnte nun vorsichtig mit einer sterilen Transferpipette abgenommen, in ein frisches Röhrchen überführt und mit 10 ml

RPMI zweimal zum Waschen für 5 min bei 1000 g aufgegossen werden. Das entstandene Pellet wurde in 10 ml RPMI mit 10 % FBS und 1 % P/S aufgenommen. Die Kryokonservierung (3.4.3) erfolgte mit  $5\text{-}10 \times 10^6$  Zellen pro Tube bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  oder für eine längere Konservierung in flüssigem Stickstoff ( $-196\text{ }^\circ\text{C}$ ).

#### 3.4.6 Herstellung biologisch intakter Membranfragmente

Membranfragmente können für bis zu 15 Monate bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  kryokonserviert werden, ohne dass dies in einer Konformationsänderung oder Herunterregulation exprimierter Oberflächenmoleküle resultiert (Tur et al., 2009). Dies beinhaltet einen Vorteil gegenüber Testungen mit vitalen Zellen, deren Kultivierungsdauer Einfluss auf die Expressierung der Epitope haben kann.

Für die Herstellung von Membranfragmenten wurden  $1 \times 10^7$  Zellen der entsprechenden Zellen (Kasumi-1, PBMC) eingesetzt und bei  $4\text{ }^\circ\text{C}$  und 200 g für 5 min zentrifugiert. Das dabei entstandene Zellpellet wurde daraufhin in 10 ml PBS aufgenommen und erneut bei gleichen Einstellungen zentrifugiert. Nachdem dieser Waschschrift noch zwei Mal wiederholt wurde, wurde das Pellet in 5 ml eiskaltem Homogenisierungspuffer aufgenommen, sofort auf Eis gestellt und währenddessen mit einer Intensität von 30 %  $10 \times 1\text{ s}$  mit 0,5 s Pausen dazwischen sonifiziert. Daraufhin schloss sich eine erneute Zentrifugation für 12 min bei 1000 g und  $4\text{ }^\circ\text{C}$  an. Der dabei entstandene Überstand wurde in Ultrazentrifugenröhrchen überführt und in einer Ultrazentrifuge bei 100000 g und  $4\text{ }^\circ\text{C}$  für weitere 20 min zentrifugiert. Das Membranpellet wurde nun in 10 ml Resuspendierungspuffer aufgenommen und erneut in der Ultrazentrifuge bei gleichbleibenden Modalitäten zentrifugiert. Das endgültige Membranpellet wurde dann in 1,2 ml PBS resuspendiert, in gewünschte Mengen aliquotiert und bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  bis zum Gebrauch eingelagert.

### 3.5 Analyse der Bindungsaktivität der scFv-Fc Fusionsproteine mittels Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie stellt ein Verfahren dar, das fluoreszenz-markierte Zellen, die an einem Lichtstrahl vorbeifließen, quantitativ erfasst.

Zur Analyse der Bindungsaktivität, der von den HEK-Zellen produzierten Überstände, die scFv-Fc Fusionsproteine enthielten, wurden diese auf Kasumi-1 durchflusszytometrisch untersucht. Zur Analyse der Spezifität sollten parallel Testungen auf PBMC's und NALM-6 Zellen vorgenommen werden. Pro Messung wurden  $0,5 \times 10^6$  Zellen mit 100  $\mu$ l des zentrifugierten Kulturüberstands (5 min, 4000 g, 4 °C) resuspendiert und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Zur Kontrolle des Hintergrunds wurde pro Zelllinie jeweils ein Ansatz mit FACS Waschpuffer und einer mit Überstand von nicht-transfizierten Zellen inkubiert, sprich ohne Primärantikörper. Nach Zugabe von 1 ml Waschpuffer erfolgte eine Zentrifugation (5 min, 2000g, RT) und das anschließende Resuspendieren des Zellpellets in 100  $\mu$ l Waschpuffer. Hierzu wurden nun 2  $\mu$ l des Sekundärantikörpers gam-FITC pipettiert und für weitere 30 min inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation und Resuspendieren des Pellets in 200  $\mu$ l 1 % PFA konnte das Fluoreszenzsignal im FACS analysiert werden.

### 3.6 Analyse der Bindungsaktivität mittels Fab-Antikörperfragmenten

#### 3.6.1 Herstellung der Fab-Antikörperfragmente

Die Herstellung löslicher Fab-Fragmente gelang über eine prokaryotische Überexpression durch den pMT2-Vektor und unter induzierbarer Regulation des Promotorsystems T7, die mit Anlegen einer ÜN-Kultur begann. Dazu wurde Material des entsprechenden Glycerolstocks eines Klons zu 50 ml 2 x YT<sub>Kan/Glu</sub>-Mediums gegeben und ÜN bei 37 °C und 200 rpm kultiviert. Am Folgetag wurde eine weitere Kultur (500 ml 2 x YT-Medium, 50  $\mu$ g/ml Kanamycin, 0,1 % Glucose) mit der vorherigen ÜN-Kultur auf eine  $OD_{600nm} = 0,09$  beimpft und bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer  $OD_{600nm} = 0,7$  inkubiert. Die anschließende Zugabe von 1 mM IPTG induzierte die Antikörperexpression, die nun bei 200 rpm für 1 h bei 30 °C durch die Prokaryonten erfolgte. Durch Zentrifugieren der Bakterien für 15 min bei 4 °C und 4000 g entstanden Pellets, die in 10 ml Lysepuffer resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert wurden. Um eine noch erfolgreichere Lyse der exprimierten Fab-Fragmente aus den Bakterien

zu erreichen, wurde das Bakterienlysat nach chemischer Lyse ebenfalls mit 15-prozentiger Intensität für 4 x 4 s mittels Ultraschallstab sonifiziert. Der entstandene Überstand wurde nach einer Zentrifugation bei 4 °C, 10000 g für 20 min mit NaOH in einen neutralen pH-Bereich von 7,4 umgepuffert, der für die anschließende Proteinaufreinigung mittels Ni-NTA-Säulen notwendig war.

Dieser Aufreinigung liegt das Prinzip der Metall-Chelat-Affinitätschromatographie zugrunde. Die exprimierten Fab-Fragmente sind Träger eines Polyhistidin-Tag (His<sub>6</sub>-Tag) (1.3.2), der bei Durchlauf durch die Ni-NTA Säulen einen Komplex (genauer: die Imidazoline der Histidine) mit Ni<sup>2+</sup> eingeht und daher selektiv gebunden werden kann. Eine gezielte Eluierung der gebundenen Proteine gelingt anschließend an den Waschprozess durch freies Imidazol mittels einer Verdrängungsreaktion (Luttmann, 2014).

Zur Proteinaufreinigung dienten hier Ni-NTA Superflow Säulen von Qiagen. Anfänglich wurden die Säulen mit 10 ml Equilibrierungspuffer equilibriert (Flußrate 1 ml/min), bevor 10 ml des aufzureinigenden Lysats ebenfalls mit einer Geschwindigkeit von 1 ml/min durch die Säule gedrückt werden konnten. Die nicht gebundenen Proteine wurden im anschließenden Waschprozess mit 10 ml Waschpuffer bei gleicher Flußrate effizient entfernt. Zur Elution der gebundenen Proteine dienten 10 ml des 250 mM Imidazol enthaltenden Elutionspuffer.

Das Eluat mit den darin gelösten Fab-Fragmenten wurde mit Hilfe von Vivaspin Turbo 15 Zentrifugalkonzentratoren konzentriert. Dabei wurde das Eluat bei 4000 g und 4 °C zentrifugiert bis ein Endvolumen von 1 ml erreicht wurde. Abschließend erfolgte eine Umpufferung der AK-Lösung mit 5 ml PBS unter Zentrifugation, ebenfalls bei 4000 g und 4 °C. Dieser Schritt wurde 2-3 Mal wiederholt bis wieder ein Endvolumen von 1 ml erreicht wurde.

Die fertig hergestellten und aufgereinigten Fab-Fragmente wurden bis zum Gebrauch bei 4 °C eingelagert.

### 3.6.2 Durchflusszytometrische Analysen auf vitalen Zelllinien

Die Vorbereitungen für diese Art der Analyse liefen identisch der durchflusszytometrischen Messungen wie in Kapitel 3.5 beschrieben ab. Auch hier sollten wieder Sensitivität und Spezifität mittels Kasumi-1, PBMC's und NALM-6 getestet werden. Pro Ansatz wurden hier 4 x 10<sup>5</sup> Zellen mit 1 µg Fab-Fragmenten inkubiert. Als Sekundärantikörper diente hier analog zu gam-FITC 0,3 µl Anti-Human IgG (Fab')<sub>2</sub> Biotin. Zum Visualisieren der Bindung im FACS wurden nun 15 ng Streptavidin mit

konjugiertem Phycoerythrin (SA-PE) hinzugegeben und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Das Fluoreszenzsignal von PE erlaubte eine quantitative Erfassung der Zellen im FACS.

### 3.6.3 Immunhistochemische Analysen

Zur Analyse der Bindeaktivität der Fab-Fragmente auf Patientenmaterial wurden erneut FFPE-Gewebeschnitte von Beckenkammtrepanaten mehrerer AML-Fälle als auch von gesunden Knochenmarksbiopsien eingesetzt. Zusätzlich wurden Gewebeschnitte von Eliminierungsorganen (Niere, Lunge) gefärbt.

Für alle immunhistochemischen Färbungen galt:

- Zur Durchführung wurde das Ultra Sensitive ABC Peroxidase Standard Kit (Thermo Scientific) angewandt (2.8).
- Alle Inkubationsschritte wurden bei RT durchgeführt.
- Je nach Größe des entsprechenden Gewebes, wurden 50-100 µl der jeweiligen Substanz auf das Gewebe des Schnitts pipettiert.
- Zur Kontrolle des Hintergrunds, d.h. zum Ausschluss unspezifischer Färbungen, wurde pro Färbung jeweils ein Schnitt ohne Zugabe des Primärantikörpers mitgefärbt.

Nach erfolgreicher Entparaffinierung und Antigendemaskierung der Gewebeschnitte (3.1.2), wurden die Schnitte zur Blockade der endogenen Gewebeperoxidase mit 0,3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol bedeckt, um sicherzustellen, dass die spätere Färbung nicht durch ein endogenes Enzym katalysiert wurde. Nach 20 min Waschen mit IHC Waschpuffer und weiteren 20 min Blocken der Schnitte mit IHC Universalblocker, um spätere unspezifische Bindungen ausschließen zu können, wurde der Primärantikörper (Fab-AK) 1:5 verdünnt für 2 h aufgetragen. Anschließend erfolgte, nach erneutem Waschen für 10 min, die Zugabe von 1 µl biotinyliertem Maus Anti-human IgG F(ab)<sub>2</sub> für 30 min im Verhältnis 1:100 (mit Universalblocker verdünnt). Währenddessen erfolgte das Ansetzen des Avidin-Biotin-Komplexes (ABC-Komplex), da Biotin und Avidin für 30 min bei 4 °C zur regelrechten Bildung des Komplexes inkubieren mussten. Hierfür wurden auf 1 ml PBS 18 µl Reagenz A und 18 µl Reagenz B vermischt. Ohne weiteren Waschvorgang wurde anschließend der ABC-Komplex für weitere 30 min auf die Gewebe pipettiert. Nach Beendigung dieser Inkubation und einem weiteren Waschschritt wurde DAB-Substrat zur Färbung auf die Gewebe

gegeben. Je nach Intensität der Braunfärbung wurde das DAB-Substrat für 5-10 min auf den Schnitten belassen.

Bei gewünschter Gegenfärbung der Zellkerne wurden die Gewebe für 1-2 min mit Hämatoxylin benetzt und zur anschließenden Bläuung (Umschlag des Farbtönen ins Blauviolette durch Erhöhung des pH-Werts) kurz in lauwarmes Leitungswasser eingetaucht.

Zur nachfolgenden Dehydrierung der Schnitte wurden die Objektträger mehrfach in eine aufsteigende Ethanolreihe (70 %, 96 %, 100 %), abschließend in Xylol eingetaucht und für eine längerfristige Konservierung mit Eindeckmedium und einem Deckglas fixiert.

Die Beurteilung und Begutachtung erfolgte mittels Lichtmikroskop durch den Leiter der Pathologie Prof. Dr. med. S. Gattenlöhner.

#### 3.6.4 Immunfluoreszenz-Analysen

Um das Bindungsverhalten der selektionierten Klone noch umfassender auf deren Spezifität untersuchen zu können, erfolgte nebst IHC noch eine weitere auf Immunmarkierung basierende Analysemethode mit FFPE-Gewebe.

Die Immunfluoreszenz stellt ein Verfahren dar, mit welchem bestimmte Oberflächenantigene durch einen Antikörper, welcher einen fluoreszierenden Farbstoff (Fluorochrom) gebunden hat, detektiert werden können.

Vor Durchführung der Schritte des Färbeprozesses, galt es die Gewebeschnitte zu entparaffinieren und deren Epitope mittels Antigendemaskierung freizulegen (3.1.2). Nach 20 min Blocken der Schnitte mit IHC Universalblocker, erfolgte die Zugabe des Primärantikörpergemischs, bestehend aus Fab-AK in einer Verdünnung von 1:10 (durch Universalblocker) und ausgewählte immunhistochemische AK zur Anfärbung ausgewählter Oberflächenmoleküle. Die Verdünnung und die anschließende Inkubation der Primärantikörper erfolgten gemäß den Angaben des Herstellers (2.7). Nachdem die Gewebeschnitte mit IHC Waschlösung für 10 min gewaschen wurden, konnten die mit Fluorescein-markierten Sekundärantikörper aufgetragen werden. Als Anti-Fab diente ein Anti-Human  $\gamma$ -IgG, der 1:500 eingesetzt wurde. Für die Maus-AK wurde  $\gamma$ -FITC (1:400) verwendet. Zum Schutz des fluoreszierenden Farbstoffes, erfolgte die 30-minütige Inkubation unter Ausschluss von Lichteinstrahlung. Nach vorsichtigem Abklopfen des Sekundärantikörpers, erfolgte eine weitere Färbung mittels des



Fluoreszenzfarbstoffs DAPI, der mit DNA interkaliert, somit die Zellkerne sichtbar und somit erst eine Analyse ermöglicht.

Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden die Fluorochrome nun durch Anwendung unterschiedlicher Wellenlängen angeregt, wodurch Zellmarkierungen sichtbar wurden.

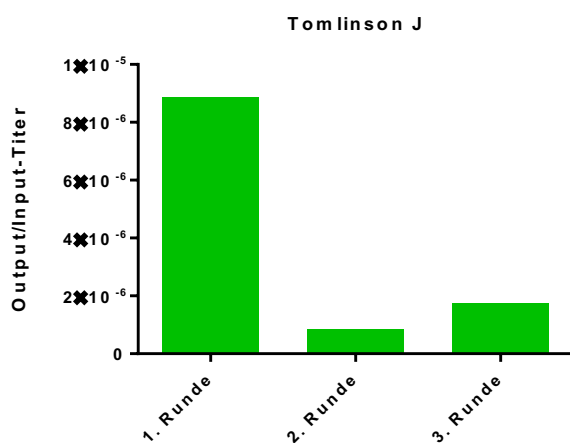
Eine Beurteilung der Ergebnisse erfolgte auch hier durch Prof. Dr. med. S. Gattenlöhner.

## 4. Ergebnisse

Die in den folgenden Kapiteln dargestellten Daten zeigen die Ergebnisse der Generierung AML-spezifischer AK gegen FFPE-Gewebe von Routine-Beckenkamm-biopsien. Die Resultate sind in Herstellung der scFv-präsentierender Phagen (4.1) und anschließender Analyse der Bindungsaktivität eingeteilt. Hierbei erfolgte die Charakterisierung auf Phagenebene (4.2), mit Hilfe von scFv-Fc Fusionsproteinen (4.3) und durch Fab-Fragmente (4.4).

### 4.1 Anreicherungsverhalten scFv-präsentierender Phagen der On-Slide-Selektion

Zur quantitativen Erfassung scFv-präsentierender Phagenpartikel vor Depletion und Selektion der jeweiligen Selektionsrunde (3.1.3), schloss sich die Berechnung des Input-Titers an. Dieser sollte von Runde zu Runde auf gleichbleibend hohem Niveau bleiben. Mit diesem ließ sich eine Aussage über eine erfolgreiche Herstellung scFv-präsentierender Phagen treffen. Der Output-Titer, berechnet nach den „panning“-Runden, stellte die Quantität der selektionierten Phagenpartikel dar und sollte bei korrektem „panning“ niedriger sein als der Input-Titer (3.1.4). Aus dem Verhältnis, bzw. des Quotienten aus Output- zu Input-Titer ergaben sich somit indirekte Hinweise auf eine erfolgreich durchgeführte Selektion.



**Abbildung 5: Balkendiagramm des Quotienten aus Output- zu Input-Titer der einzelnen Selektionsrunden im Vergleich**

Ein Anreicherungsverhalten konnte von der zweiten auf die dritte Selektionsrunde beobachtet werden.

Wie Abbildung 5 verdeutlicht, war ein Anstieg dieses Verhältnisses lediglich von Runde zwei auf drei zu beobachten. Hier zeigte sich eine Zunahme des Quotienten von  $8,29 \times 10^{-7}$  auf  $1,74 \times 10^{-6}$ .

Tabelle 11 gibt einen Überblick der errechneten Zahlenwerte aller Titer, der ermittelten Quotienten sowie der sich daraus ergebenden Anreicherungs faktoren.

**Tabelle 11: Input- und Output-Titer der einzelnen Selektionsrunden im Vergleich sowie die daraus resultierenden Anreicherungs faktoren**

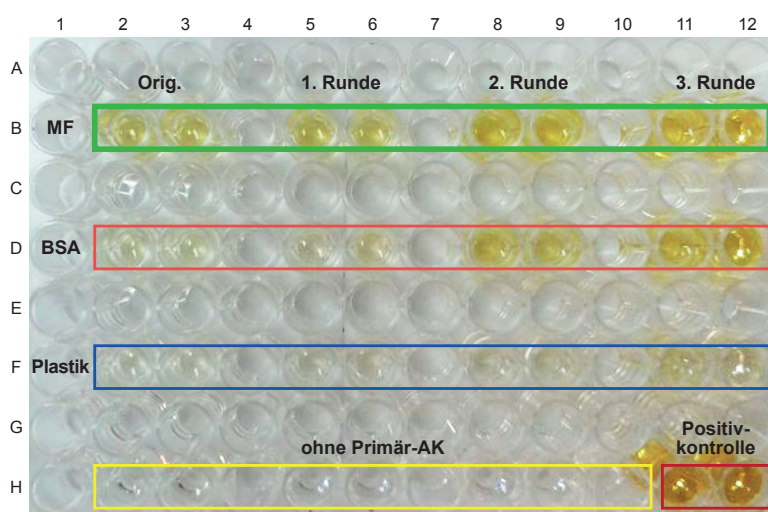
Runde	Input-Titer	Output-Titer	Output/Input	Anreicherungs faktor
1	$2,59 \times 10^{13}$	$2,30 \times 10^8$	$8,88 \times 10^{-6}$	-
2	$3,22 \times 10^{13}$	$2,67 \times 10^7$	$8,29 \times 10^{-7}$	0,1fach
3	$1,67 \times 10^{13}$	$2,89 \times 10^7$	$1,74 \times 10^{-6}$	0,2fach

Zur Bestimmung des Anreicherungs faktors wurde zwischen dem berechneten Verhältnis von Output- zu Input-Titer jeweils der direkte Vergleich zu dem der ersten Runde gezogen. Da dieser Faktor jeweils  $<1,1$  blieb, ließ sich keine Anreicherung scFv-präsentierender Phagen der Runden zwei und drei im Vergleich zur ersten beobachten. Dieser Faktor beinhaltet lediglich quantitative Aussagekraft, keine hinsichtlich Bindungseigenschaften wie Affinität und Kreuzreaktivität einzelner Klone.

## 4.2 Analyse des Bindungsverhalten scFv-präsentierender Phagen

### 4.2.1 Polyklonaler ELISA

Nach drei abgeschlossenen Selektionsrunden galt es, eine Anreicherung AML-bindender scFv-präsentierender Phagen mittels ELISA nachzuweisen (3.2.1). Verglichen wurden jeweils selektionierte scFv-präsentierende Phagenpartikel einer Selektionsrunde mit denen der original Tomlinson Bibliothek J.

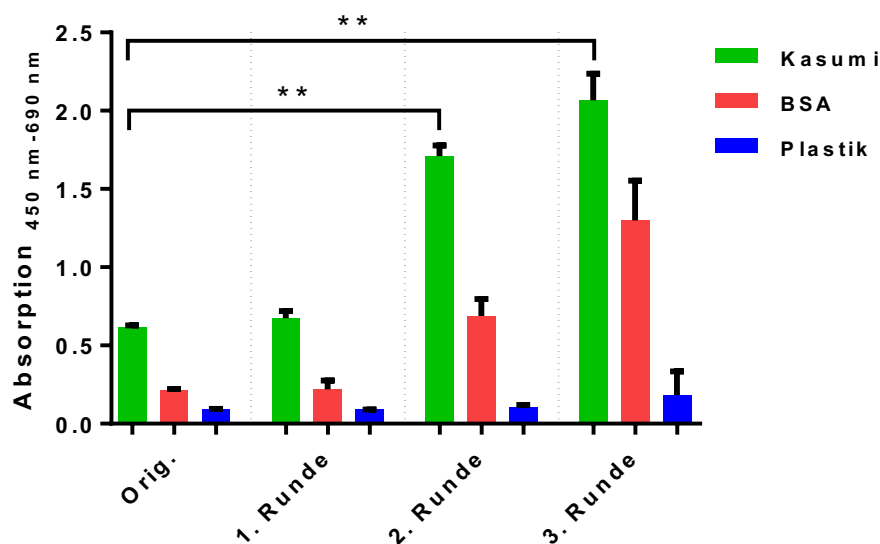


**Abbildung 6: Bild einer ELISA-Mikrotiterplatte des Resultats des polyklonalen ELISAs**

Die zu untersuchende Probe wurde zur späteren Bildung des Mittelwertes als Dublette angelegt. Zur Kontrolle des Hintergrunds wurde für jedes zu testende Antigen eine Dublette ohne Primärantikörper getestet. Die Positivkontrolle zum Nachweis einer korrekten Durchführung wurde mit Anti-CD30 Ki-4 scFv durchgeführt (Klimka et al., 1999).

Die Farbintensität korrelierte mit der Menge an spezifisch gebundenen Phagenpartikeln, dabei galt eine gelbe Farbreaktionen als positive und keine bzw. eine schwach gelbe Farbreaktion als negatives Ergebnis. Es konnten ansteigende Absorptionswerte auf den MF der Kasumi-1 Zelllinie in Abhängigkeit zur Selektionsrunde dokumentiert werden.

Der Proteinnachweis gelang mit Anti-M13 konjugierten HRP und TMB. Die quantitative Erfassung der Absorptionsstärke (in nm) erfolgte anschließend im ELISA-Reader.

**Abbildung 7: Balkendiagramm der Absorptionsstärke in nm der getesteten scFv-präsentierende Phagen der unterschiedlichen Runden im Vergleich zur original Tomlinson J Bibliothek**

Membranfragmente der Zelllinie Kasumi-1 (grün) dienten als Positivantigene, BSA (rot) und Plastik (blau) als Negativantigene. Dargestellt sind die Messergebnisse als Mittelwerte ermittelt aus Dubletten und deren berechneter Standardabweichung, sowie die signifikanten Unterschiede (\*) der Selektionsrunden im vgl. zur orig. Tomlinson Bibliothek J, es galt: \* = signifikant ( $p < 0,05$ ), \*\* = hoch signifikant ( $p < 0,01$ ), \*\*\* = höchst signifikant ( $p < 0,001$ ).

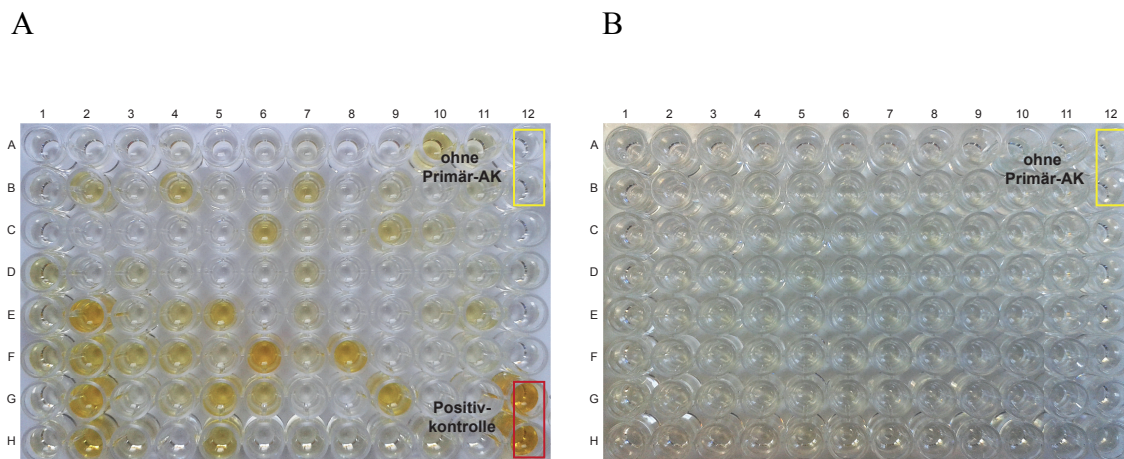
Es zeigte sich ein eindeutiger Anstieg von Runde zu Runde der Absorptionswerte auf dem Positivantigen Kasumi-1 und somit hoch signifikante Unterschiede im direkten Vergleich zur original Tomlinson Bibliothek J.

Abbildung 7 zeigt eine kontinuierlich ansteigende Anreicherung scFv-präsentierender und AML-bindender Phagenpartikel auf MF der Kasumi-1 Zelllinie von Runde zu Runde. Während von Runde eins zur original Tomlinson Bibliothek noch keine signifikante Anreicherung erfolgte, ließ sich in den Runden zwei und drei im Vergleich zur original Bibliothek eine hochsignifikante Anreicherung beobachten.

Mittels BSA und Plastik als Negativantigene sollte eine Kreuzreaktivität ausgeschlossen werden. Während die Absorptionswerte auf Plastik stetig in einem niedrigen Bereich gemessen wurden, zeigte sich parallel zu ansteigenden Messwerten auf Kasumi-1 auch ein Anstieg auf BSA.

#### 4.2.2 Monoklonaler ELISA

Nach dem Nachweis einer Anreicherung von AML-spezifischen scFv-präsentierender Phagen galt es, nun Analysen einzelner Klone auf Phagenebene anzuschließen. Hierfür wurden 88 Klone gepickt, die im ELISA auf Membranfragmenten von Kasumi-1 und löslichen BSA getestet werden sollten. Die Bindung wurde auch hier mittels Anti-M13 konjugierten HRP und TMB detektiert.



**Abbildung 8: Bild einer ELISA-Mikrotiterplatte des Resultats des ersten monoklonalen ELISAs, 88 Klone getestet auf MF Kasumi (A) und auf BSA (B)**

Zur Kontrolle des Hintergrunds wurde sowohl für Kasumi-1, als auch für BSA eine Dublette ohne Primärantikörper angelegt. Die Positivkontrolle zum Nachweis einer korrekten Durchführung wurde mit Anti-CD30 Ki-4 scFv durchgeführt (Klimka et al., 1999).

Die Farbintensität korrelierte mit der Menge an spezifisch gebundenen Phagenpartikeln, dabei galt eine gelbe Farbreaktionen als positive und keine bzw. eine schwach gelbe Farbreaktion als negatives Ergebnis. Die differierenden Absorptionswerte in A weisen auf Klone mit unterschiedlich starken Bindungsverhalten zum Positivantigen Kasumi-1 hin (A), wobei bei allen eine Kreuzreaktivität auf dem irrelevanten Antigen BSA ausgeschlossen werden konnte (B).

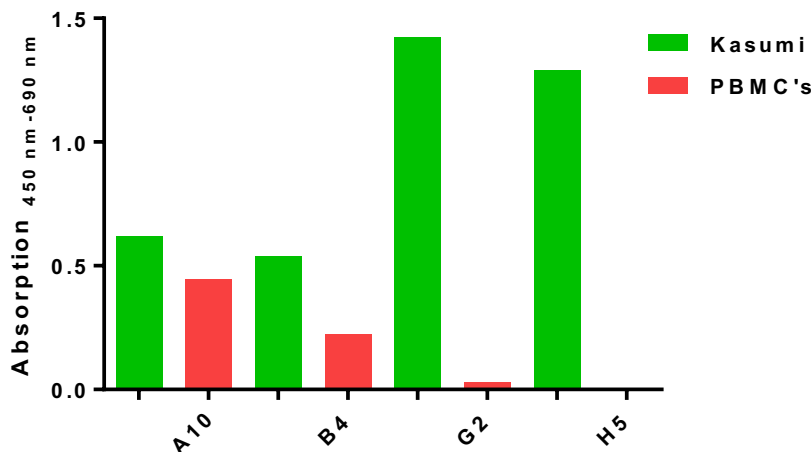
Mehr als die Hälfte der gepickten Klone zeigte eine mindestens schwache Bindungsaffinität zur AML-Zelllinie. Drei weitere Klone wurden als moderate und zwei als starke Binder eingeteilt (Tabelle 12). Alle gepickten Klone wiesen auf einer zweiten mit Negativantigen BSA gecoateten Mikrotiterplatte keine höheren Absorptionswerte als  $\geq 10$ -mal des Hintergrundsignals auf, weswegen eine Kreuzreaktivität auf BSA ausgeschlossen werden konnte (Abbildung 8, B).

**Tabelle 12: Einteilung der positiv getesteten Klone im ersten monoklonalen ELISA nach Absorptionsstärke**

schwach = 10-100-mal über dem Hintergrundsignal, moderat = 100-200-mal, stark >200-mal

positive Klone	schwach	moderat	stark
50 von 88 (56,8%)	45	3	2

Zur Darstellung der Reproduzierbarkeit der Testergebnisse wurde anschließend ein weiterer monoklonaler ELISA durchgeführt. Getestet wurden hier die 20 Klone mit höchster Absorptionsstärke des ersten monoklonal durchgeführten ELISAs. Hier zeigten sich vier Klone wiederholt positiv: A10, B4, G2 und H5. Die Benennung der Klone erfolgte aufgrund der Position in der Mikrotiterplatte. Die Bindungsaffinität wurde bei allen vier als schwach eingestuft, da deren Absorptionsstärke im Bereich von 10-100-mal über dem Hintergrundsignal lag: A10 – 16,9-mal, B4 – 13,5-mal, G2 – 46,1-mal, H5 – 42,2-mal. G2 und H5 wiesen eine deutlich höhere Absorptionsstärke auf Kasumi-1 auf, als die beiden anderen positiv getesteten Klone. Darüber hinaus war deren Bindungsaffinität zu PBMC's mit < 6-mal über dem Hintergrundsignal, gering.



**Abbildung 9: Balkendiagramm der Absorptionsstärke in nm der positiv getesteten Klone im zweiten monoklonalen ELISA**

Membranfragmente der Zelllinie Kasumi-1 (grün) dienten als Positivantigene, PBMC's (rot) als Negativantigene.

Es zeigten sich Unterschiede in der Bindungsstärke der vier analysierten Klone, wobei G2 und H5 als stärker bindende Klone identifiziert werden konnten. A10 wies sowohl eine geringe Bindungsstärke zum Positivantigen, als auch eine vergleichsweise hohe Kreuzreaktivität zum Negativantigen PBMC auf.

Aufgrund der wiederholt hohen Absorptionsstärke des Klons A10 auf Negativantigen PBMC's, wurde dieser für die folgenden Analysen nicht weiter berücksichtigt. Weitergeführt wurden die drei aussichtsreichsten Klone (B4, G2, H5) hinsichtlich eines optimalen Verhältnisses des Bindungsverhaltens auf Positiv- und Negativantigenen.

### 4.3 Produktion und Analyse des Bindungsverhaltens löslicher scFv-Fc Fusionsproteine

#### 4.3.1 Vorbereitungen zur eukaryotischen Genexpression

In einem Sequenzierungsschritt (3.3.4) der ELISA-positiven Klone sollte sowohl die Exklusivität eines Klons nachgewiesen werden, als auch die Frage ob und wo innerhalb der Gensequenz ein Stopcodon lokalisiert ist. Diese wurden dann anschließend durch ortsgerichtete Mutagenese zur Aminosäure Glutamin ummutiert (3.3.8). Bei den sequenzierten Klonen lag das Stopcodon jeweils in der CDR2-Region der variablen schweren Kette. Aufgrund der unterschiedlichen Basensequenzen in der CDR2-Region der einzelnen Klone, mussten individuelle Mutageneseprimer für den entsprechenden PCR-Ansatz designt werden (siehe Tabelle im Anhang).

H5 wies in der variablen Region der  $V_H$  kein Stopcodon auf, weswegen hier der Schritt der Mutagenese übersprungen werden konnte.

Nach erfolgter Mutagenese wurde deren Erfolg in einer weiteren Sequenzierung (3.3.4) überprüft.

**Tabelle 13: Aminosäuresequenz der leichten und schweren Ketten der selektierten Klone nach ortsgerichteter Mutagenese**

Q\* = Glutamin, Aminosäure nach Mutagenese. Erläuterung des Einbuchstabencodes der Aminosäuren siehe Tabelle im Anhang.

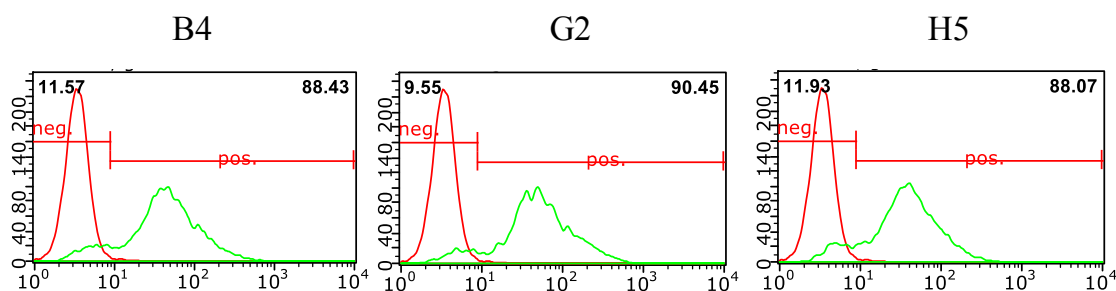
Die Tabelle zeigt neben der Einzigartigkeit der isolierten Klone auch eine erfolgreich durchgeführte Mutagenese in die Aminosäure Glutamin an.

Klon	Variable Region $V_H$			Variable Region $V_L$		
	CDR1	CDR2	CDR3	CDR1	CDR2	CDR3
<b>B4</b>	GFTFSSYA	ISQ*SGGLT	AKRGRKFDY	QSISSY	SAS	QQTKKRPT
<b>G2</b>	GFTFSSYA	ISRSGAQ*T	AKQRNRFDY	QSISSY	AAS	QQHRHRPKT
<b>H5</b>	GFTFSSYA	ISRDGRHT	AKRYKKFDY	QSISSY	NAS	QQKRKKPPT

Bevor die Transfektion der Fremd-DNA in HEK-Zellen zur eukaryotischen Genexpression und damit die Herstellung löslicher scFv-Fc Fusionsproteine beginnen konnte, musste eine Umklonierung erfolgen. Hierbei wurde die genetische Sequenz aus dem Phagemid-Vektor pIT2 in den eukaryotischen Expressionsvektor pMS2 umkloniert (3.3.9). Die Überprüfung auf korrekte Umklonierung erfolgte mittels Sequenzierung (3.3.4).

### 4.3.2 Transfektionskontrolle der HEK 293T Zellen

Zur Feststellung der Effizienz der Transfektion und damit auch der Basis einer qualifizierten Herstellung löslicher scFv's, erfolgte eine Transfektionskontrolle im Durchflusszytometer (3.4.4). Durch ein GFP-Gen, das auf dem eukaryotischen Expressionsvektor pMS2 kodiert ist, kotranslatieren erfolgreich transfizierte HEK-Zellen, neben den löslichen scFv's, auch ein grün fluoreszendierendes Protein (eGFP). Dies ermöglichte die Kontrolle der Transfektionseffizienz mittels Analyse der Intensität des fluorimetrischen Signals in der Durchflusszytometrie.



**Abbildung 10: Histogramm-Darstellung der Transfektionseffizienz der HEK-293T Zellen mittels Durchflusszytometrie**

Darstellung der Zellzahl auf Y-Achse (Count), grüne Fluoreszenz in logarithmischer Darstellung auf X-Achse (GRN-HLog). Als Negativkontrolle dienten bei allen Messungen nicht-transfizierte HEK-Zellen (rotes Histogramm).

Eine deutliche Verschiebung des grünen Fluoreszenzsignals zeigte eine erfolgreiche Transfektion der HEK-293T Zellen mit den codierenden Sequenzen aller drei Klone an.

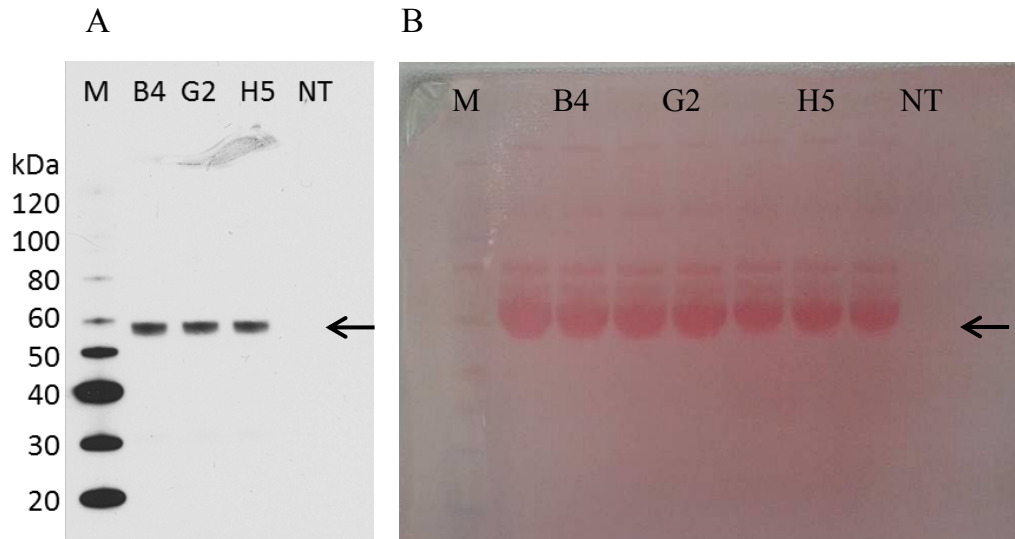
Der Anteil der transfizierten Zellen lag bei allen drei Klonen um 90 %, wodurch von einer erfolgreichen Transfektion und somit auch von einer Produktion von scFv-Fc Fusionsproteinen ausgegangen werden konnte. Die Fragestellung nach regelrechter Herstellung der löslichen AK-Fragmente wurde anschließend im Western Blot untersucht.

### 4.3.3 Überprüfung der Herstellung mittels Western Blots

Wie unter 3.3.10 beschrieben erfolgte eine Kontrolle auf qualitative Herstellung der scFv-Fc Fusionsproteine mittels Western Blot. Eine Ponceau-Färbung (Abbildung 11, B), direkt nach dem eigentlichen Blotten, zeigte einen erfolgreichen Proteintransfer, sowie erste Hinweise auf die Größe des Proteins. Zu diesem Zeitpunkt konnte noch kein Unterschied zwischen dem nicht-transfizierten Überstand und den löslichen AK aufgezeigt werden. Dies stellte sich erst in der finalen Auswertung des Western Blots, der Autoradiographie, dar (Abbildung 11, A).



In beiden Verfahren des Proteinnachweises konnte die erwartete Größe von 57 kDa verifiziert werden, weswegen von einer regelrechten Herstellung der löslichen scFv-Fc Fusionsproteine durch die HEK-Zellen ausgegangen werden konnte.



**Abbildung 11: Nachweis der Herstellung der scFv-Fc Fusionsproteine im Western Blot (A) und in der Ponceau-Färbung (B)**

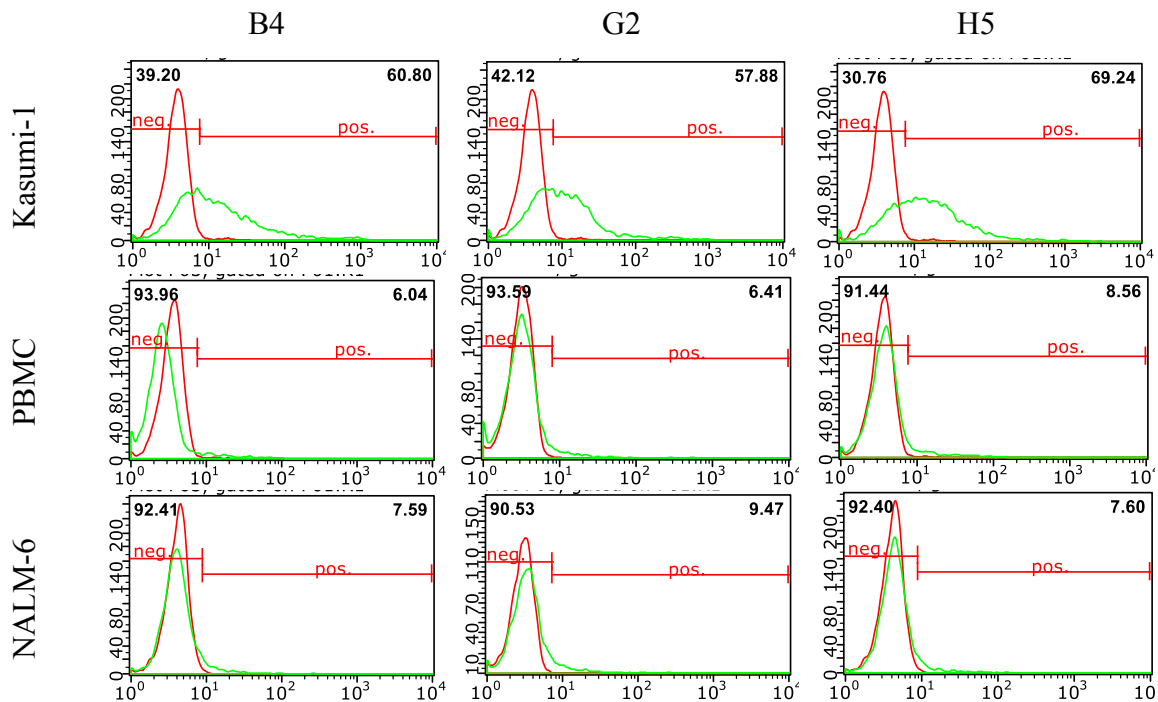
In der Ponceau-Färbung wurden jeweils Dubletten getestet.

M = verwendeter Proteinmarker, NT = Überstand aus nicht-transfizierten HEK 293T-Zellen.

In beiden Verfahren konnte die erwartete Größe von 57 kDa eines Fusionsproteins verifiziert werden (Pfeilmarkierung).

#### 4.3.4 Durchflusszytometrische Analysen des Bindungsverhaltens auf Zelllinien

Nachdem die korrekte Herstellung löslicher scFv's mittels Western Blot verifiziert wurde, konnten sich Analysen des Bindungsverhaltens anschließen. Zur Kontrolle der Sensitivität der AML-Binder wurde Kasumi-1, zur Spezifitäts-Kontrolle PBMC's und die ALL-Zelllinie NALM-6 eingesetzt. Vor der eigentlichen FACS-Messung erfolgte eine Inkubation der vitalen Zellen mit Primärantikörper-enthaltenden Kulturüberstand. Eine potentielle Bindung der scFv-Fc Fusionsproteine an die Zelllinien wurde anschließend mittels fluoreszierenden Sekundärantikörpers gam-FITC durchflusszytometrisch detektiert.



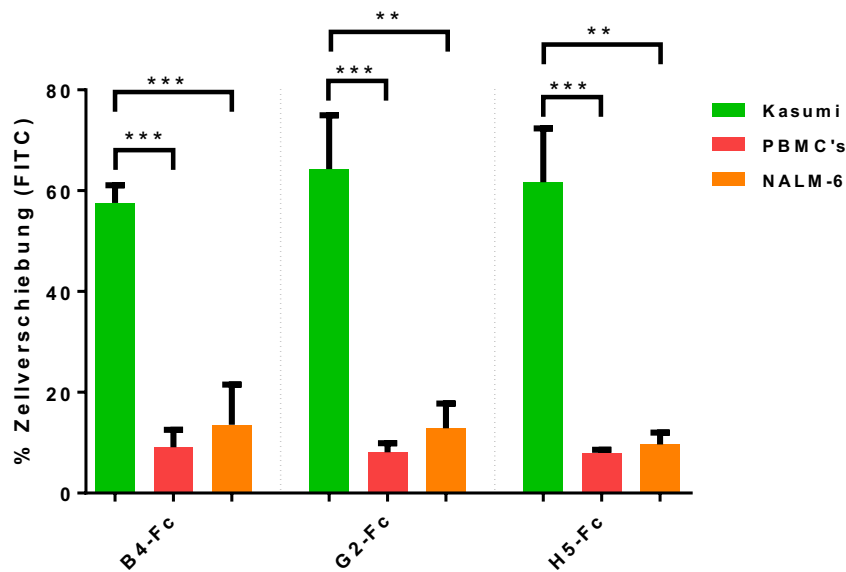
**Abbildung 12: Histogramm-Darstellung des Bindungsverhaltens der scFv-Fc Fusionsproteine auf Zelllinien mittels Durchflusszytometrie**

Darstellung der Zellzahl auf Y-Achse (Count), grüne Fluoreszenz in logarithmischer Darstellung auf X-Achse (GRN-HLog). Kasumi-1 diente als Positivzelllinie, PBMC's und NALM-6 als Negativzelllinie zur Kontrolle der Kreuzreaktivität. Zur Kontrolle des Hintergrundsignals diente bei allen Messungen Überstand nicht-transfizierter HEK-Zellen (rotes Histogramm).

Die deutliche Verschiebung des grünen Fluoreszenzsignals auf Kasumi-1 Zellen korrelierte mit einem starken Bindungsverhalten aller getesteten Klone. Eine Bindung auf den Negativantigenen PBMC's und NALM-6 konnte widerlegt werden.

Es zeigte sich bei allen drei Klonen eine Verschiebung des Fluoreszenzsignals der Kasumi-1 Zellen >60 %. Die Verschiebungen auf den Negativzelllinien PBMC's und NALM-6 stellten sich bei allen Klonen nur unter 10 %, dar.

Während Abbildung 12 das Bindungsverhalten einer Messung der scFv-Fc's auf Zelllinien in der Durchflusszytometrie lediglich exemplarisch veranschaulicht, ist in Abbildung 13 das Resultat dreier Messungen und deren Mittelwerte mit entsprechender Standardabweichung als Balkendiagramm dargestellt.



**Abbildung 13: Bindungsverhalten der löslichen scFv-Fc Fusionsproteine auf Zelllinien mittels Durchflusszytometrie**

Dargestellt sind die Messergebnisse als Mittelwerte ermittelt aus Triplikaten und deren berechneter Standardabweichung. Einteilung der Bindeaktivität erfolgte nach der Zellverschiebung in % in schwache (20-50 %), moderate (50-70 %) und starke (>70 %) Binder. Weiterhin sind signifikante Unterschiede (\*) der positiv getesteten scFv's auf Kasumi-1 (grün) im Vergleich zu den Kontrollzelllinien PBMC's (rot) und NALM-6 (orange) dargestellt. Es galt: \* = signifikant ( $p < 0,05$ ), \*\* = hoch signifikant ( $p < 0,01$ ), \*\*\* = höchst signifikant ( $p < 0,001$ ).

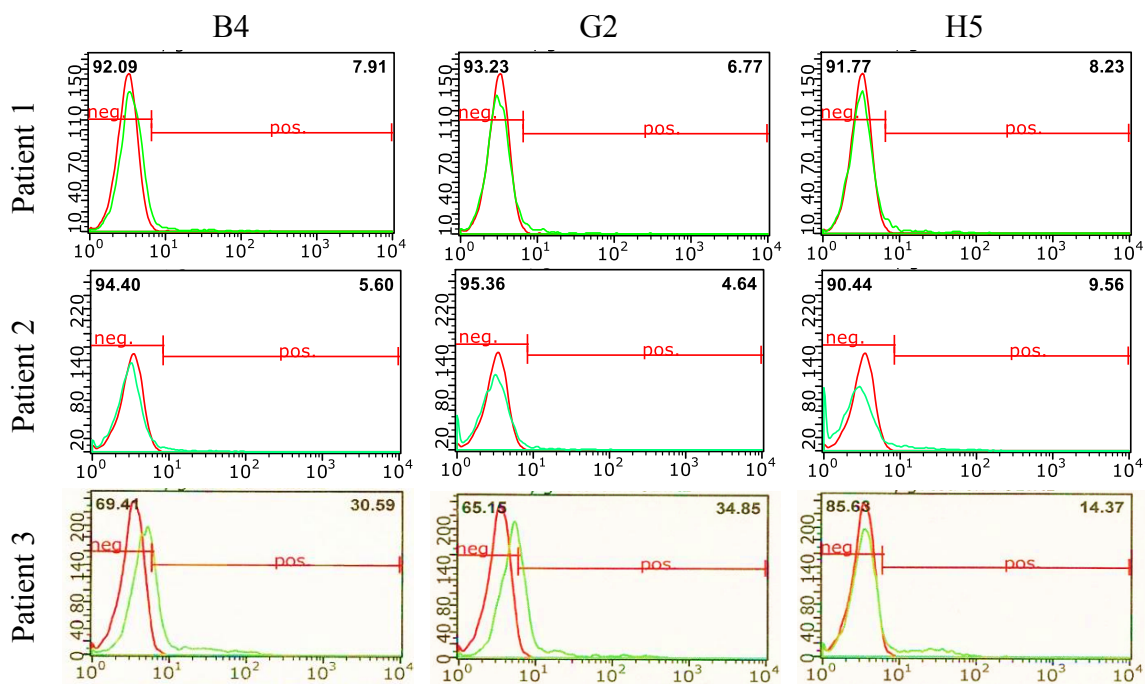
Es zeigte sich stets ein mindestens hoch signifikanter Unterschied zwischen den gemessenen Fluoreszenzsignalen auf Kasumi-1 im Vergleich zu jenen, die auf den Negativantigenen detektiert wurden. Eine Bindung auf den Negativantigenen PBMC's und NALM-6 konnte durch niedrige Werte der Zellverschiebung (<20 %) widerlegt werden.

Nach dreifacher Messung mittels Durchflusszytometrie, zeigte sich G2 als der stärkste Klon hinsichtlich der prozentualen Zellverschiebung des grünen Fluoreszenzsignals der Kasumi-1 Zellen. Hinsichtlich der Einteilung der Bindeaktivität der Klone, handelte es sich hierbei um einen moderaten Binder. Zusätzlich konnten hier höchst signifikante Unterschiede im direkten Vergleich der Messungen auf PBMC's detektiert werden. Die Unterschiede Kasumi-1 zu NALM-6 wurde mit einem  $p < 0,01$  als hoch signifikant berechnet. Auch bei den beiden anderen Klonen, B4 und H5, die eine etwas geringere Verschiebung der Kasumi-1 Zelllinie in % aufwiesen, handelte es sich dennoch bei H5 um einen starken und bei B4 um einen moderaten Binder. Im direkten Vergleich zu beiden Kontrollzelllinien wurden hier mindestens hoch signifikante Unterschiede errechnet.

Bei einer gemessenen Zellverschiebung <20 % auf PBMC's und NALM-6 aller drei Klone, konnte hierbei keine Bindeaktivität festgestellt und somit eine Kreuzreaktivität der scFv-Fc Fusionsproteine ausgeschlossen werden.

### 4.3.5 Durchflusszytometrische Analysen des Bindungsverhaltens auf PBMC's von AML-Patienten

Nachdem eine AML-typische Bindung der selektierten Klone auf Membranfragmenten und vitalen Zellen in den zuvor ausgeführten Ergebnissen nachgewiesen werden konnten, sollte das Bindungsverhalten auf Patientenmaterial analysiert werden. Im Unterschied zur Selektion, die auf FFPE-Schnitten erfolgte, wurden nun aus AML-Blut isolierte PBMC's (3.4.5) für durchflusszytometrische Bindungsanalysen verwendet.



**Abbildung 14: Histogramm-Darstellung des Bindungsverhaltens der scFv-Fc Fusionsproteine auf PBMC's von drei an AML erkrankten Patienten mittels Durchflusszytometrie**

Darstellung der Zellzahl auf Y-Achse (Count), grüne Fluoreszenz in logarithmischer Darstellung auf X-Achse (GRN-HLog). Als Negativkontrolle diente bei allen Messungen Überstand nicht-transfizierter HEK-Zellen (rotes Histogramm).

Es ließ sich kein Bindungsverhalten aller drei analysierten Klone auf den PBMC's der ersten beiden Patienten nachweisen. Eine lediglich schwache Bindung zeigte sich bei den Klonen B4 und G2 bei den PBMC's von Patient 3.

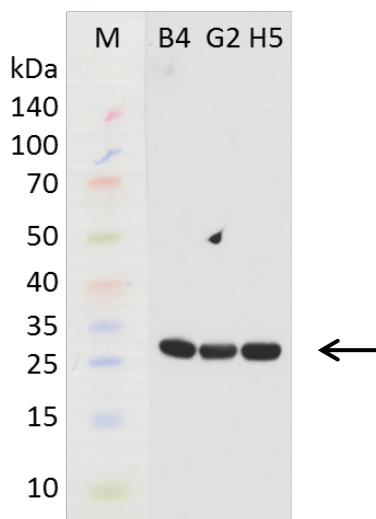
Wie die Histogramme in Abbildung 14 verdeutlichen, konnte kein Bindungsverhalten der scFv-Fc Fusionsproteine auf den PBMC's der Patienten 1 und 2 nachgewiesen werden. Die Zellverschiebung lag hier meist deutlich unter 10 %. Mit Zellverschiebungen um 30 % zeigte sich eine schwache Bindeaktivität der Klone B4 und G2 auf den PBMC's des dritten Patienten. Eine Bindeaktivität des Klones H5 ließ sich bei diesem Patienten allerdings nicht beobachten.

#### 4.4 Analyse des Bindungsverhaltens von Fab-Antikörperfragmenten

Nachdem die selektierten Klone in Form von scFv-Fc's bereits auf genannten Zelllinien und AML-Patienten-Blut auf ihre Bindungsaktivität analysiert worden sind, schließen sich weitere Testungen, die vordergründig die Spezifität untersuchen sollen, an. Hierfür wurden die Verfahren der Immunhistochemie und der Immunfluoreszenz als Analysemethoden auf FFPE-Gewebeschnitten, sowie die bereits durchgeführte Durchflusszytometrie, eingesetzt. Dafür wurden die scFv-Fragmente zu Fab-Fragmenten umgewandelt. Die genetischen Sequenzen wurden hierfür aus dem pMS2-Vektor in den pMT2-Vektor umklontiert (3.3.9). Dieser erlaubte eine prokaryotische Expression von Fab-Antikörperfragmenten (3.6.1).

##### 4.4.1 Überprüfung der Herstellung mittels Western Blot

Auch hier wurde erneut zur Überprüfung einer korrekten Herstellung ein Western Blot angeschlossen (3.3.10). Die eigentliche Größe eines vollständigen Fab-Fragmentes beträgt 50 kDa. Durch die im Western Blot verwendeten Reagenzien, wie z.B. der Sample Puffer, erfolgte eine Aufspaltung der Disulfidbrücken, sodass  $V_H$  und  $V_L$  parallel zueinander vorlagen. Deren einzelne Größe beträgt ca. 26 kDa, die auch im durchgeführten Western Blot verifiziert werden konnte und eine fehlerlose Produktion anzeigte (Abbildung 15).



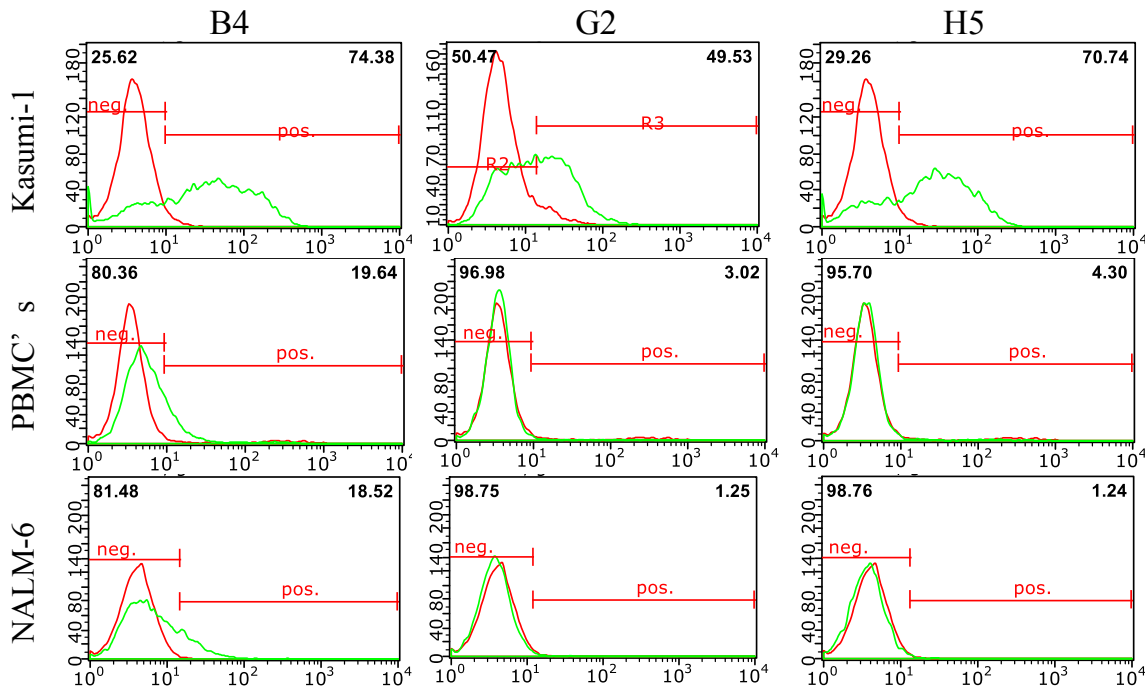
**Abbildung 15: Nachweis der Herstellung der Fab-Fragmente im Western Blot**

M = verwendeter Proteinmarker, Colourmarker.

Die erwartete Größe von ca. 26 kDa eines Fab-Fragments konnte verifiziert werden (Pfeilmarkierung).

#### 4.4.2 Durchflusszytometrische Analysen des Bindungsverhaltens auf Zelllinien

Zur Gegenüberstellung der Ergebnisse wurden analog zu den vorangegangenen FACS-Analysen die zuvor eingesetzten vitalen Zelllinien erneut verwendet. Eine etwaige Bindung wurde mittels biotinylierten Sekundärantikörper und an Streptavidin gekoppeltes PE durchflusszytometrisch registriert.

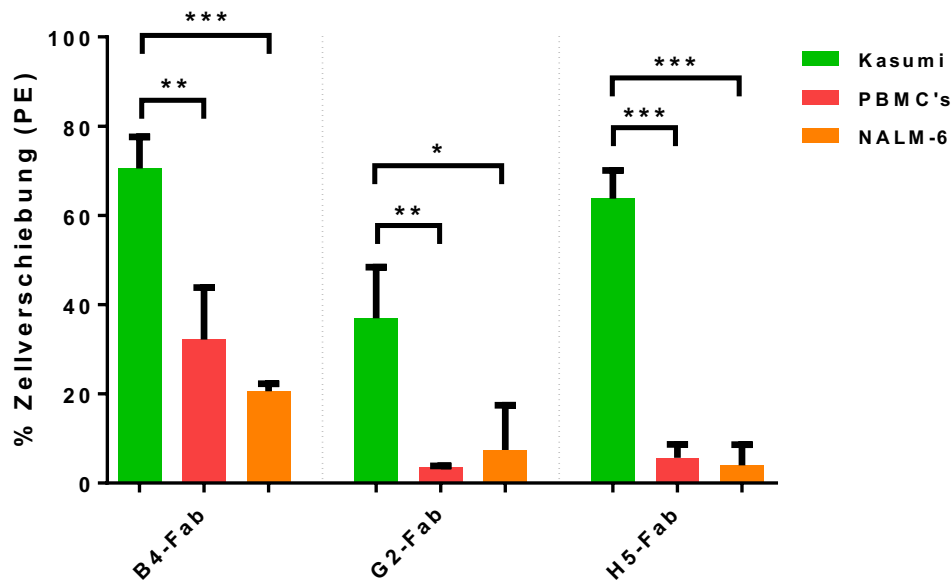


**Abbildung 16: Histogramm-Darstellung des Bindungsverhaltens der Fab-AK-Fragmente auf Zelllinien mittels Durchflusszytometrie**

Darstellung der Zellzahl auf Y-Achse (Count), grüne Fluoreszenz in logarithmischer Darstellung auf X-Achse (GRN-HLog). Kasumi-1 diente als Positivzelllinie, PBMC's und NALM-6 als Negativzelllinie zur Kontrolle der Kreuzreaktivität. Als Negativkontrolle diente bei allen Messungen eine Färbung ohne Primärantikörper (rotes Histogramm).

Die deutliche Verschiebung des grünen Fluoreszenzsignals auf Kasumi-1 Zellen, korrelierte mit einem starken Bindungsverhalten aller getesteten Klone. Eine Bindung auf den Negativantigenen PBMC's und NALM-6 konnte widerlegt werden.

Abbildung 16 zeigt lediglich exemplarische Resultate einer durchflusszytometrischen Analyse der Fab-Antikörperfragmente auf vitalen Zelllinien an. Eine statistische Datenauswertung mehrerer Messungen ist in Abbildung 17 veranschaulicht.



**Abbildung 17: Bindungsverhalten der Fab-Antikörperfragmente auf Zelllinien mittels Durchflusszytometrie**

Dargestellt sind die Messergebnisse als Mittelwerte ermittelt aus Triplikaten und deren berechneter Standardabweichung. Einteilung der Bindeaktivität erfolgte nach der Zellverschiebung in % in schwache (20-50 %), moderate (50-70 %) und starke (>70 %) Binder. Weiterhin sind signifikante Unterschiede (\*) der positiv getesteten Fab-Fragmente auf Kasumi-1 (grün) im Vergleich zu den Kontrollzelllinien PBMC's (rot) und NALM-6 (orange) dargestellt. Es galt: \* = signifikant ( $p < 0,05$ ), \*\* = hoch signifikant ( $p < 0,01$ ), \*\*\* = höchst signifikant ( $p < 0,001$ ).

Es zeigte sich meist ein mindestens hoch bis höchst signifikanter Unterschied zwischen den gemessenen Fluoreszenzsignalen auf Kasumi-1 im Vergleich zu jenen, die auf den Negativantigenen detektiert wurden. Ein lediglich signifikanter Unterschied zeigte sich im direkten Vergleich zwischen den Messungen auf Kasumi-1 des Klones G2 zu NALM-6.

Die berechneten Mittelwerte aus drei FACS-Messungen erwiesen B4 als starken, H5 als moderaten und G2 als schwachen Binder. Bei Klon H5 konnten die niedrigsten p-Werte im Vergleich der Zellverschiebung der Kasumi-1 Zelllinie zu den Negativzelllinien errechnet werden, wodurch sich höchst signifikante Unterschiede ergaben. Betrachtet man hingegen Klon G2, konnten neben der eher schwachen AML-Bindungsstärke, ebenfalls höhere Werte für p im Vergleich zu den Negativkontrollen, gleichbedeutend mit einer geringen Signifikanz, beobachtet werden.

Ausgehend von der prozentualen Zellverschiebung (<20 %) auf PBMC's und NALM-6 konnte hier keine Bindeaktivität der Fab-Fragmente aller drei Klone nachgewiesen werden. Eine Ausnahme hierzu stellte eine schwache Bindung des Klons B4 auf PBMC's dar.

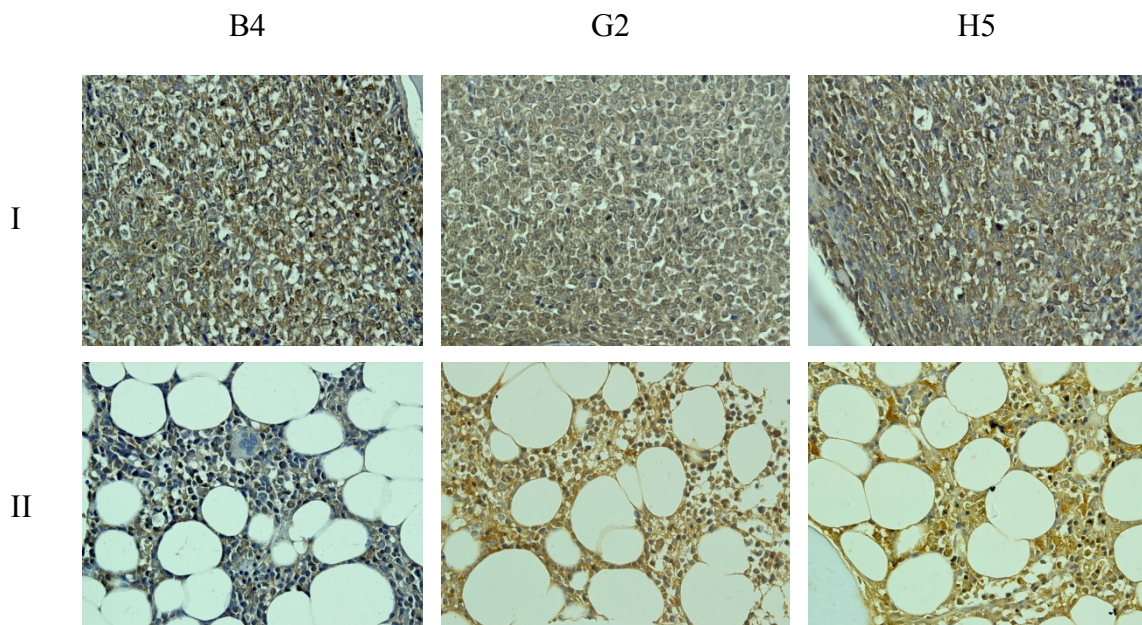
#### 4.4.3 Immunhistochemische Analysen

Nachdem eine AML-spezifische Bindeaktivität sowohl auf MF und vitalen Zelllinien, aber nicht auf Blutzellen an AML-erkrankten Patienten gelang, schlossen sich Bindeanalysen auf FFPE-Schnitten an. Da diese gleichzeitig auch das Ausgangsgewebe der Selektion darstellten, waren Resultate dieses Verfahrens von besonderem Interesse.

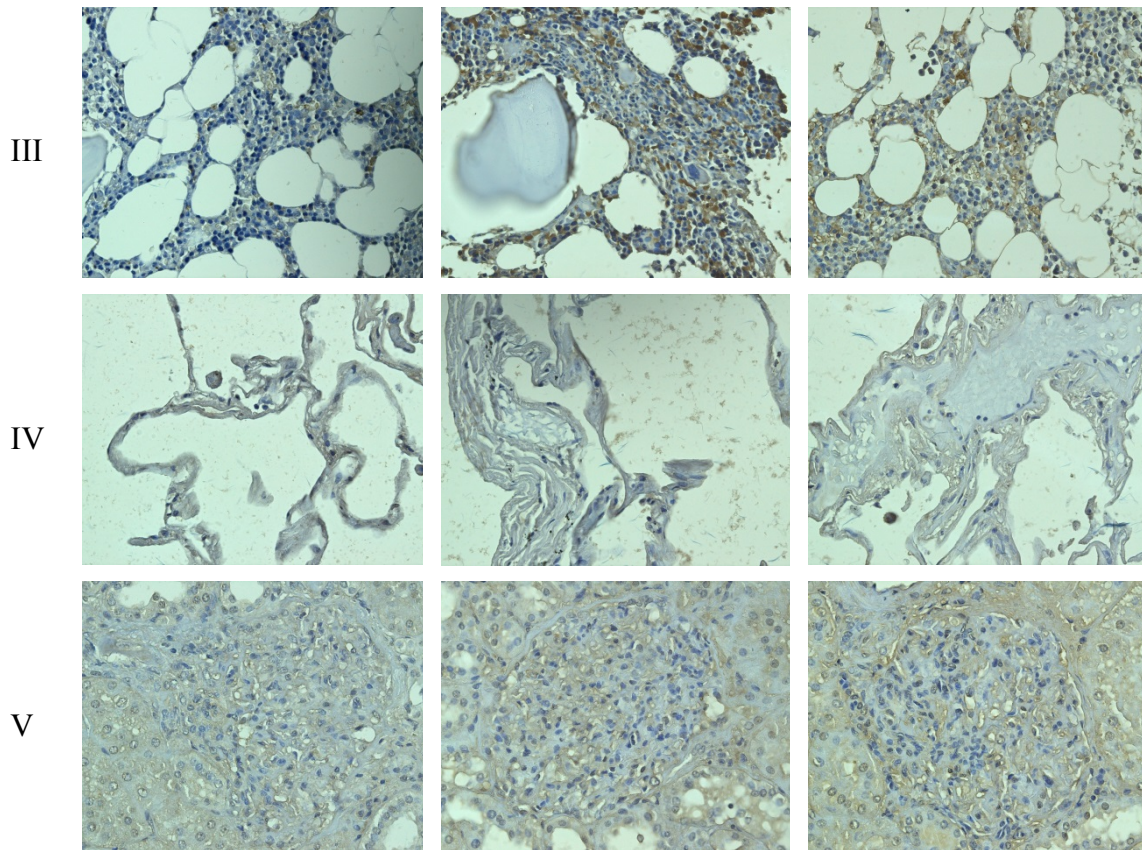
Die Bindeaktivität der Fab-Antikörperfragmente sollte sowohl auf Beckenkamm-trepanaten des Selektionsgewebes, als auch auf solchen weiterer AML-Patienten mit geringerem Blastenanteil und auf morphologisch normentsprechendem Knochenmark analysiert werden. Zur Kontrolle der Bindungsspezifität wurden ebenfalls Analysen auf Schnitten von gesunden Organen durchgeführt. Hierfür wurden FFPE-Schnitte malignomfreier Lunge und Niere eingesetzt.

Um ideale Färberesultate zu erzielen, galt es, die optimale Methode der Antigendemaskierung auszumachen (3.1.2). In Vorversuchen (Daten nicht gezeigt) konnte beobachtet werden, dass sich durch reine Entparaffinierung der Gewebsschnitte die besten Endresultate erzielen ließen.

Die Fab-Fragmente wurden jeweils 1:5 verdünnt eingesetzt. Deren Bindung wurde durch biotinyliertem Anti-Human IgG Sekundärantikörper und DAB (Braunfärbung) detektiert. Eine Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit Hämatoxylin.







**Abbildung 18: Resultate immunhistochemischer Färbungen der Fab-Antikörperfragmente auf diversen Geweben**

Gefärbt wurden biopsische Materialien unterschiedlicher Ursprungsgewebe: AML M2 mit Blastenanteil 100 % (I), AML M2 mit Blastenanteil 50 % (II), infiltrat- und malignomfreies Knochenmark (III), infiltrat- und malignomfreie Lunge (IV), infiltrat- und malignomfreie Niere (V). Die Aufnahmen sind jeweils in 40-facher Vergrößerung dargestellt.

Die Färbeintensität korrelierte jeweils mit dem Blastenanteil bei den Klonen G2 und H5. Eine Bindung mit dem Klon B4 wurde dagegen als schwach eingestuft. Ein Bindungsverhalten auf malignomfreiem Knochenmark, sowie gesundem Lungen- und Nierengewebe konnte nicht detektiert werden. Schwache Braunfärbungen sind auf unspezifischen Hintergrundfärbungen begründet.

Bei der Färbung der Knochenmarkstanze mit 100 % Blastenanteil (I), die dem Selektionsgewebe entsprach, ließ sich sowohl makro- als auch mikroskopisch keine sichere Aussage bezüglich unterschiedlicher Bindungsaktivität der zu untersuchenden Klone treffen. Daher wurden weitere AML-Stanzen mit niedrigeren Blastenanteilen gefärbt. Exemplarisch sind die Färbungen eines Patienten-Falls mit 50-prozentigem Blastenanteil aller Knochenmarkszellen aufgeführt (II). Hier zeigte sich B4 eindeutig als schwächster Klon und H5 als vermeintlich stärkster, da eine Abstufung der braunangefärbten Zellen mit Abnahme des Blastenanteils der Stanzen korrelierte. Mikroskopisch konnte eine geringe Kreuzreaktivität auf infiltratfreiem Knochenmark nachgewiesen werden, die stärkste Färbung stellte sich auch hier durch H5 dar (III). Die schwache Braunanfärbung der Ausscheidungsorgane Lunge (IV) und Niere (V) kam

nach mikroskopischem Nachweis nicht durch eine Epitop-AK-Bindung bzw. Färbung, sondern eher durch ein Hintergrundrauschen zustande, sodass auch hier von keiner wesentlichen Kreuzreaktivität ausgegangen werden konnte.

#### 4.4.4 Immunfluoreszenz-Analysen

Zur präziseren Darstellung welche Zellen die Fab-Antikörperfragmente in der IHC tatsächlich gebunden haben, wurde anschließend das Verfahren der Immunfluoreszenz genutzt. Verwendung fanden hier erneut Beckenkammpreparate eines AML M2 Patienten (Abbildung 19, A) und von morphologisch gesundem Knochenmark (Abbildung 19, B). Es wurde exemplarisch mit dem stärksten Binder der vorherigen Fab-Analysen, H5, getestet.

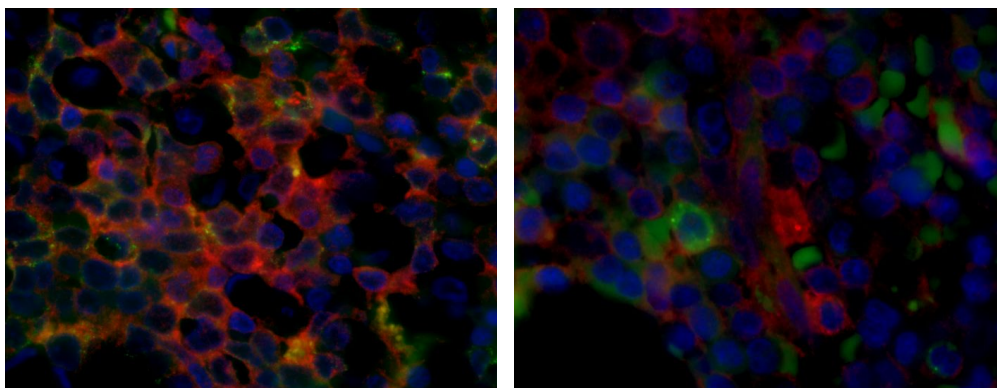
Zur Gegenüberstellung wurden Oberflächenmarker ausgewählt, die sowohl die myeloische, als auch die lymphatische Zellreihe berücksichtigten: Glycophorin C (GYPC) gegen Erythrozyten, CD61/Integrin  $\beta 3$  gegen Megakaryozyten und Thrombozyten, CD68 gegen Monozyten und Makrophagen, CD20 gegen B-Lymphozyten und CD3 gegen T-Lymphozyten. Als Oberflächenmarker für die AML-spezifischen Blasten diente das hämatopoetische Vorläuferzellantigen CD34. Eine Doppelfärbung durch die Fabs's und einer der Oberflächenmarker sollte im Falle einer spezifischen Bindung nur bei den Myeloblasten erfolgen.

Bei allen Färbungen wurde der Primärantikörper 1:10 eingesetzt. Die Bindungen wurden mittels Sekundärantikörper gam FITC für die genutzten Oberflächenmarker und Anti-Human  $\gamma$ -IgG Cy3 für die Fab-Fragmente detektiert. DAPI kontrastierte die Zellen bzw. deren Zellkerne zu den Oberflächenbindungen. Zur Kontrolle des Hintergrundsignals wurde pro Färbung auch immer ein Schnitt ohne Primärantikörper mitgeführt.

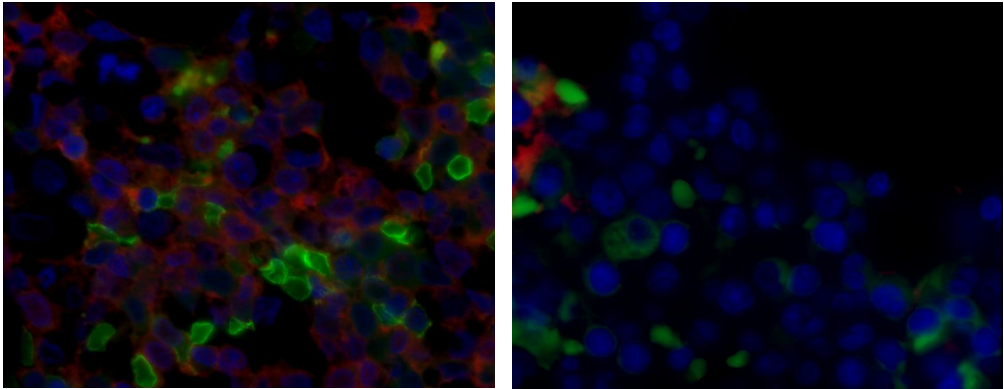
A

B

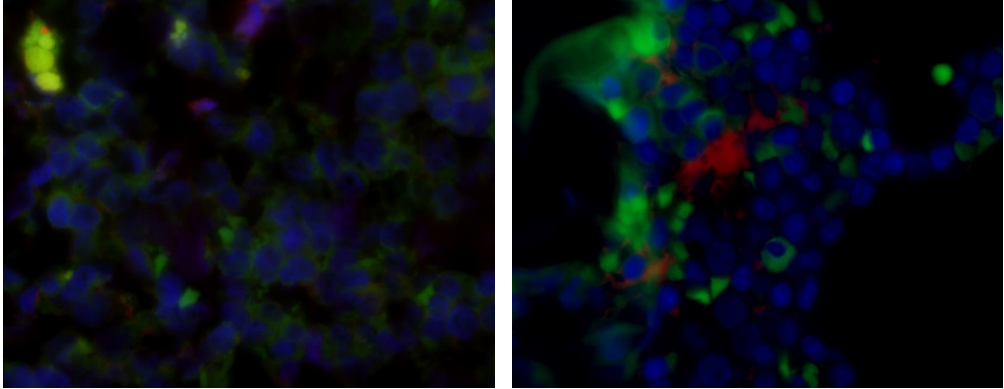
CD34



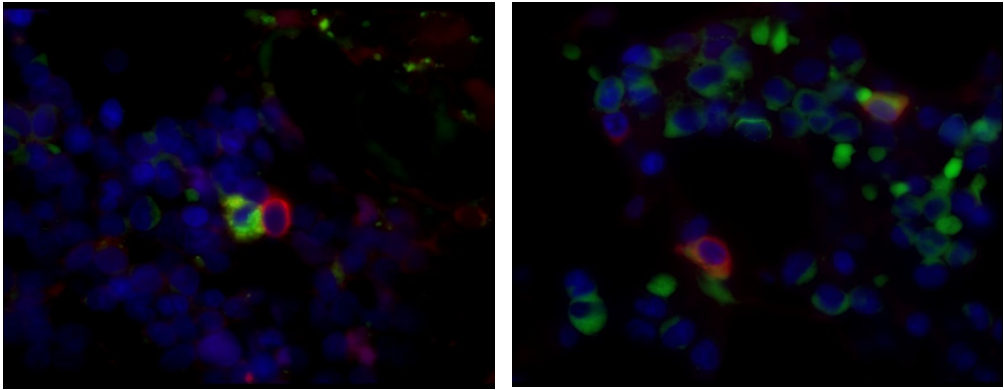
GYPC



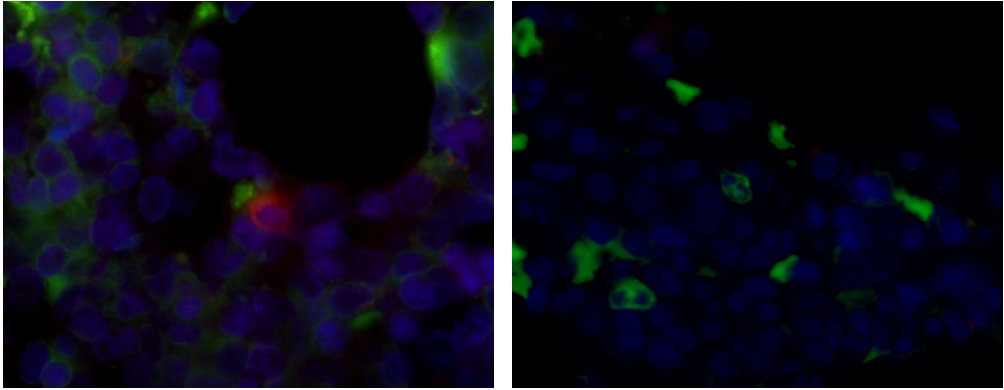
CD3



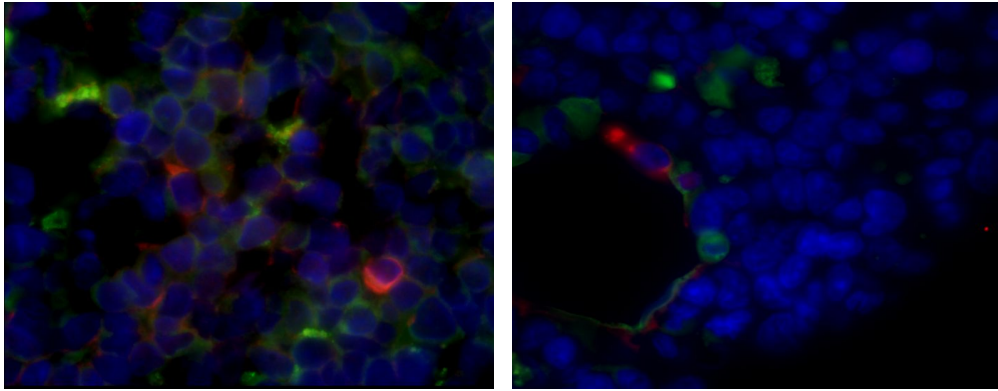
CD20



CD61



CD68



**Abbildung 19: Resultate der Immunfluoreszenz-Färbungen des Fab-Antikörperfragments H5 auf Beckenkammrepanaten einer AML M2 (A) und morphologisch gesundem Knochenmark (B) mit Gegenfärbungen relevanter Oberflächenmoleküle**

Rotes-Fluoreszenz-Signal – Fab-Bindung, grünes Fluoreszenz-Signal – Bindung der Oberflächenmarker, gelbes Fluoreszenzsignal – Doppelbindung Fab und Oberflächenmarker, blaues Fluoreszenzsignal – Anfärbung von DNA (entspricht den Zellkernen). Die Aufnahmen sind jeweils in 63-facher Vergrößerung dargestellt.

Eine Doppelfärbung durch die Fab-Fragmente und den CD34-Marker konnte auf der Knochenmarkstanze des an AML-erkrankten Patienten visualisiert werden.

Durch Addition des Fluoreszenzsignals der roten und grünen Wellenlängen entstand ein mikroskopisch sichtbares gelbes/oranges Fluoreszenzsignal, das eine Doppelfärbung visualisierte. Dies konnte auf dem AML-Schnitt durch Fab's und CD34 beobachtet werden. Auf allen anderen Schnitten ließ sich ein solches Signal nicht nachweisen, sodass von einer gezielten Blastenbindung durch die Fab-Antikörperfragmente ausgegangen werden konnte. Diese These unterstützt das Fehlen des roten Fluoreszenzsignals auf den Schnitten des gesunden Knochenmarks. Eine Ausnahme hierzu stellt die Färbung einzelner Zellen auf der Gegenfärbung mit CD34 auf dem gesunden Knochenmarksschnitt dar.

Auf den AML-Schnitten, die mit den Oberflächenmarkern CD61, CD20 und CD3 gefärbt wurden, zeigten sich nur geringe rote Fluoreszenzsignale, was für eine nur mäßige Fab-Antikörper-Bindung sprach. Einzelne Zellen sind hier hingegen gut mit dem grünen Fluorochrom markiert, was einen erfolgreichen Oberflächenprotein-nachweis durch den entsprechenden Antikörper zeigte. Das optimalste Verhältnis von parallel nebeneinanderliegenden rot- und grün-markierten Zellen zeigte sich bei der Doppelfärbung mit GYCP. Eine Bindung des Fab-Antikörper-Fragments an erythropoetische Vorläuferzellen konnte hiermit negiert werden.

## 5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde durch die etablierte Methode des Phage Displays, im Rahmen einer On-Slide Selektion, AML M2-assoziierte Antikörper aus der Tomlinson-Antikörperbibliothek J isoliert. Deren charakteristische Eigenschaften wurden durch unterschiedliche Analysemethoden *in vitro* veranschaulicht (Kapitel 4). Ergebnisse dieser Analysen, sowie sich daraus ergebende diagnostische und therapeutische Möglichkeiten sollen nun in folgenden Kapiteln kritisch diskutiert werden.

### 5.1 Der Selektionsprozess

Die Rahmenbedingungen einer Selektion mit Auswahl und Charakter des Selektions- bzw. Depletionsantigens oder weiteren die Selektion beeinflussenden Faktoren, wie beispielsweise Auswahl des Helferphagen, bestimmen entscheidend den Erfolg in der Isolierung spezifischer Antikörperfragmente.

#### 5.1.1 FFPE-Gewebe als Selektionsantigen – Die On-Slide Selektion

Die Selektion auf immobilisierten, aufgereinigten Antigenen (Proteinen), z.B. durch Beschichtung einer Mikrotiterplatte, stellt eine der einfachsten Arten der Durchführung des „panning“-Prozesses dar (Griffiths et al., 1993). Sowohl durch den Aufreinigungsprozess an sich, als auch durch die Entfernung des Antigens aus seinem ursprünglichen Gewebeverbund, können Oberflächenantigene ihre ursprüngliche Konformation verlieren, sodass isolierte Binder lediglich Bindeaktivität zum aufgereinigten, isoliertem statt zum nativen, oberflächenassoziierten Antigen aufweisen (Watkins und Ouwehand, 2000; Ruan et al., 2006) (1.3.5). Die Selektion auf eukaryotischen ganzen Zellen, aus körpereigenem Material isoliert (Marks et al., 1993) oder auf Zelllinien artifiziellen Ursprungs (Fitting, 2012), stellen ebenfalls oft genutzte Optionen dar. Es konnte gezeigt werden, dass durch mehrere Schritte der Kultivierung artifizieller Zelllinien diese zu einer Modifikation der Oberflächenantigene neigen (Tur et al., 2009; Arab et al., 2002). Auch hierin besteht abermals die Gefahr gegen ein nicht natives Epitop zu selektionieren.

Die genannte Problematik kann durch eine Selektion auf FFPE-Gewebe umgangen werden. Formalin-Fixierung und Einbettung in Paraffin stellen standardisierte Techniken dar, um die ursprüngliche Gewebemorphologie von Biopsaten durch das Abstoppen von autolytischen Prozessen, auch über den Zelltod hinaus, zu konservieren. Formalin (neutral gepufferte, wässrige Formaldehydlösung) bindet an Proteine unter

Erhalt ihrer Sekundärstruktur, sodass Antigenstrukturen und teilweise Enzymaktivitäten bestehen bleiben sowie Querverbindungen im Gewebe durch Anbau von Methylolgruppen gebildet werden. Eine Dehydrierung des Gewebes wird durch Anwendung einer aufsteigenden Ethanol-Reihe realisiert und bereitet das Gewebe auf den Einbettungsprozess mit Paraffinwachs vor. Xylol als Intermedium vermittelt zwischen 100 % Ethanol und Paraffin, sodass es anschließend zur Paraffin-Infiltration kommen kann. Von den getrockneten Gewebeblöcken werden mittels Schlittenmikrotom Schnitte mit einer Dicke zwischen 0,5 und 60  $\mu\text{m}$  angefertigt (Lang, 2013).

Für eine erfolgreiche Selektion von spezifischen AK-Fragmenten ist es essentiell, die Zugänglichkeit der Oberflächenmoleküle durch Entparaffinierung und Aufbrechen der Quervernetzungen, die durch die Formalin-Fixation entstehen, herbeizuführen (3.1.2). Unterschiedliche Demaskierungs-Behandlungen sind hierfür etabliert. Man unterscheidet hitzeinduzierte (HIER) von proteolytischen (PIER) Verfahren. Bei hitzeinduzierten Methoden werden FFPE-Schnitte in Puffern für mehrere Minuten bei ca. 160 W in der Mikrowelle aufgeköcht, wodurch Quervernetzungen gespalten und verbliebene Paraffinreste entfernt werden (Ikeda et al., 1998). Enzymatische Digestion (PIER), z.B. mit Proteinase K oder Trypsin, erlauben ebenfalls die Rückkehr der Epitope in ihre native Konformation (Miller, 2001). Darüber hinaus besteht die Option, dass Antigene ohne jegliche Vorbehandlung mit reiner Entparaffinierung bestmöglichst demaskiert werden. Dies bestätigen unter anderem die Studien von Ramos-Vara und Beissenherz, die die zuvor beschriebenen Methoden mit 63 Markern (monoklonale und polyklonale AK) während IHC-Analysen miteinander verglichen. 49,2 % der Marker zeigten die höchste Funktionalität nach hitzeinduzierter Demaskierung, 35 % unter Verwendung von Proteinase K. Die verbleibenden ca. 15 % wiesen beste Wirksamkeit bei ausschließlicher Entparaffinierung auf (Ramos-Vara und Beissenherz, 2000).

Da die optimalste Vorbehandlung auch im Rahmen dieser Arbeit zuvor nicht bekannt war, wurden FFPE-Schnitte mit allen zuvor erläuterten Methoden vor den „panning“-Runden behandelt. Shi *et al.* zeigten darüber hinaus eine Abhängigkeit des pH-Werts der Puffer bei hitzeinduzierten Verfahren auf die Qualität der Demaskierung von unterschiedlichen Antigenen (Shi et al., 1995). Unter Berücksichtigung dieses Aspekts erfolgte in vorliegender Arbeit eine parallele Verwendung eines sauren (Citrat, pH ca. 6,0) und eines alkalischen (EDTA, pH ca. 8,0) Puffers.

Durch Überführung der eluierten Phagen nach erfolgter Selektion in ein einziges Gefäß, kann keine endgültige Aussage über die Art der optimalsten Vorbehandlung getroffen werden. Die Resultate des polyklonalen Phagen-ELISAS mit stetigem Anstieg der Absorptionsstärke (hoch signifikante Werte der Runden 2 und 3 Bezug nehmend auf die Original-Tomlinson Bibliothek) auf der AML-Zelllinie Kasumi-1 von Runde zu Runde (4.2.1), implizieren jedoch eine eindeutig erfolgreich durchgeführte Demaskierung der Epitope.

Neben dem Vorteil der Selektion auf nativen, in ihrem physiologischen Gewebeverbund vorliegenden Antigenen, sind lange Stabilität und Haltbarkeit des FFPE-Gewebe als weitere Vorzüge zu nennen. Archivierte Biopsien in Form von FFPE-Gewebeschnitten sind bei regelrechter Anfertigung und Lagerung über mehrere Jahre hinweg stabil (Lang, 2013). Die Gewinnung des Materials ist durch routinemäßige Abläufe im Rahmen der AML-Diagnostik standardisiert (1.1.2). Es bedarf keiner weiteren den Patienten potentiell belastenden Maßnahmen. Natürlich ist der Einsatz der On-Slide Methode zur Selektion spezifischer AK nicht nur im Rahmen anderer Tumorentitäten denkbar (s.o.), sondern auch bei Erkrankungen, die einer generellen histopathologischen Sicherung der klinischen Diagnose bedürfen und daher FFPE-Material ohnehin archiviert vorliegt.

Eine Selektion auf artifiziellen Zelllinien ist gleichermaßen etabliert. Fitting, die ebenfalls spezifische AK gegen AML M2 aus einer Phagemid-basierten Bibliothek isolierte, selektionierte auf viablen Zellen der Zelllinie Kasumi-1 in Suspension. Eine erfolgreiche Selektion konnte auch hier mittels anschließendem Phagen-ELISA und einer hochsignifikanten Anreicherung der dritten Selektionsrunde vergleichend mit der Original-Bibliothek dokumentiert werden (Fitting, 2012). Die Selektion auf Tumorzellen *in situ* (FFPE-Gewebe) besitzt im direkten Vergleich auch hier einige Vorteile. Nutzt man kultivierte Zellen artifiziellen Ursprungs, ist die Wahrscheinlichkeit gegeben, AK ohne klinische Relevanz zu isolieren, was einen potentiellen Einsatz in Diagnostik oder Therapie direkt am Patienten erschwert. Hinzu kommt die bereits zuvor erwähnte Problematik der Konformationsänderung der Epitope nach wiederholtem Passagieren der Zellen in Kultur. Nicht zuletzt bedarf es bei der Kultivierung von Zellen als Antigen oder der Herstellung von synthetischen Proteinen als Selektionsantigene

eines gewissen Vorbereitungszeitraums, der bei der Selektion auf FFPE-Material entfällt.

Weiterhin ist die spätere Paraffingängigkeit der generierten AK durch die Selektion auf FFPE-Gewebe gewährleistet. Dies stellt einen beträchtlichen Vorteil dar, bedenkt man den häufigen Einsatz monoklonaler AK in der Routine-Diagnostik, beispielsweise in der IHC. Ein bekanntes Problem rekombinant hergestellter AK besteht häufig in der fehlenden Reaktivität auf Paraffin-eingebettetem Gewebe (Jarutat et al., 2007). In vorliegender Arbeit konnte die Paraffingängigkeit der selektionierten Binder durch spezifische Oberflächenmarkierung der Myeloblasten in der IHC dokumentiert werden (4.4.3).

Das Konzept der Generierung spezifischer AK mittels Phage-Display unter Verwendung von FFPE-Material ist nicht unbeschrieben. Im Jahr 2007 gelang es Jarutat *et al.*, einen Selektionsprozess mit FFPE-Gewebe durchzuführen und Vimentin-spezifische AK zu isolieren. Der Selektionserfolg wurde mittels IHC überprüft und es zeigten sich 97,6 % aller getesteten Klone nach der sechsten „panning“-Runde (3,1 % nach der vierten Runde) als Vimentin-relevante Binder (Jarutat et al., 2007). Während der Selektionsprozess auf 2x2 cm großen Gewebeschnitten (Mantelzelllymphom-Biopsate zur Selektion und Tonsillen-Biopsate zur Depletion) in Reaktionsgefäßen schwimmend konkretisiert wurde, gingen Haaf und Kollegen (2015) einen innovativen Schritt weiter. Der „panning“-Prozess wurde direkt auf Glasobjektträgern in Form von FFPE-Schnitten realisiert. Während Jarutat und Mitarbeiter gegen ein bekanntes Antigen (Vimentin) selektionierten, führte Haaf die Selektion gegen ein unbekanntes Epitop des kleinzelligen Bronchialkarzinoms („small cell lung cancer“, SCLC) durch. Nach der dritten Runde zeigten 207 von 440 getesteten Klonen (entspricht 47,1 %) ein positives Signal auf SCLC-MF im anschließenden Phagen-ELISA (Haaf et al., 2015).

Im gleichen Jahr führten parallel dazu Larsen *et al.* Selektionen spezifischer AK ebenfalls auf FFPE-Gewebe durch. Auch hier wurde gegen ein vorher bekanntes Epitop (vgl. Jarutat), CD31 von Endothelzellen eines Brustbiopsats, selektioniert (Larsen et al. 2015). Auch hier konnten positive Resultate detektiert werden: 40 Klone, die im Phagen-ELISA analysiert wurden, stellten sich als vier redundante Klone heraus, die allerdings sehr hohe Absorptionswerte auf Endothelzelllinien im direkten Vergleich zur Negativprobe aufwiesen.



Eine Problematik beinhaltet die On-Slide Selektion auf FFPE-Gewebe dennoch. So könnte die Heterogenität des gewählten Gewebes vergleichend mit einer Selektion auf purem, aufgereinigtem Antigen eine Isolation von unspezifischen AK induzieren. Denn das in vorliegender Arbeit verwendete FFPE-Gewebe in Form von Beckenkamm-trepanaten schließt neben Vorläuferzellen aller drei hämatopoetischen Reihen auch Fettmark innerhalb der Markraumfläche sowie Knochenzellen mit ein.

Ein Verfahren zur Generierung homogener Zelltypen/Strukturen aus Zellverbunden stellt die „laser capture microdissection“ (LCM) dar, die auch im Rahmen der Phage-Display-Technologie häufig eingesetzt wird (Lu et al., 2004; Ruan et al., 2006). Jedoch zeigte sich, dass die Gewebeexzision mittels Lasers und der Arbeitsschritt der Gewebe-Dehydratation die Viabilität der Phagen negativ beeinflusst (Sun et al., 2009). Aufgrund dieses den Selektionserfolg möglicherweise limitierenden Faktors, wurde in vorliegendem Projekt auf den Einsatz von LCM verzichtet. Stattdessen sollte mit einer gezielten und strategischen Gewebeauswahl der Aspekt der Gewebheterogenität größtmöglich minimiert werden. Genutzt wurden Routine-Beckenkammbiopsien eines AML-Patienten mit einem Blastenanteil von annähernd 100 % (bezogen auf Markraumfläche sowie Gesamtheit aller Knochenmarkszellen) mit weitgehend vollständig fehlender Resthämatopoese und einem Fettmarkgehalt von 0 % (mikroskopische Beurteilung durch einen Facharzt der Pathologie).

Darüber hinaus fiel die Wahl des Selektionsgewebes bewusst auf Biopsien einer AML Typ M2 mit Ausreifung nach FAB-Klassifikation. Dieser Subtyp ist mit einer relativen Häufigkeit von ca. 30 % aller akuten myeloischen Leukämien von besonderer klinischer Relevanz (1.1.3).

Die zuvor dargestellten Vorteile sowie weitere Erfahrungen in exemplarisch aufgeführten Studien, zeigen eine Selektion mit oder auf FFPE-Material als mindestens gleichwertige Alternative zu Standardselektionsprozessen auf aufgereinigten, immobilisierten Antigenen (1.3.5). Nicht zuletzt bestätigen die Ergebnisse der On-Slide Selektion der vorliegenden Arbeit, dass es möglich ist, AK mit spezifischer Bindungsaktivität zu viablen Zellen, sogar auf fixiertem und damit nicht mehr lebendigem Material, zu selektionieren. Dies dokumentieren die Resultate der Durchflusszytometrie, die stets auf intakten, vitalen Zellen durchgeführt wurde (4.3.4, 4.4.2).

### 5.1.2 Effizienz der Selektion

Die zentralen Kernparameter einer effizienten Selektion, die gegeneinander abgewogen werden müssen, stellen Stringenz und Ertrag dar. Durch Anpassung der Strenge der Selektionsbedingungen werden taugliche bzw. spezifische Klone, gegenüber jenen mit geringerem Bindungspotential zum Zielantigen, präferiert, wobei man einen quantitativen Verlust toleriert (Stringenz). Unter dem Begriff Ertrag versteht man die quantitative Anreicherung selektionierter Klone ungeachtet ihrer Spezifität (Smith und Petrenko, 1997). Unter Berücksichtigung beider Kernparameter und somit optimaler Anpassung der Selektionsmodalitäten, kann eine größtmögliche Anreicherung von spezifischen Klonen erreicht werden, was einer optimalen Selektionseffizienz entspricht.

Eine Aussage über die quantitative Anreicherung AK-präsentierender Phagenpartikel (Ertrag), kann mit der Berechnung der Phagen-Titer getroffen werden (3.1.4). Basis einer erfolgreichen Selektion ist die ausreichende Produktion infektiöser Phagenpartikel, die mit dem Input-Titer beschrieben wird. Dieser sollte von Runde zu Runde auf gleichbleibend hohem Niveau zwischen  $10^{11}$  und  $10^{13}$  stagnieren (Christ, 2010). Mit Zahlenwerten stets höher als  $10^{13}$  in vorliegender Arbeit (4.1), kann die Herstellung der Phagenpartikel als gelungen bezeichnet werden. Als Zeichen eines korrekten „pannings“ muss der Output-Titer stets niedriger sein als der Input-Titer und zwischen  $10^7$  und  $10^9$ , im besten Falle von Runde zu Runde ansteigend, liegen. Auch diese vorgegebenen Zahlenwerte konnten in vorliegender Arbeit erreicht werden, jedoch konnte ein Anstieg dieses Titers lediglich von Runde 2 zu Runde 3 dokumentiert werden.

Setzt man den Output- im Verhältnis zum Input-Titer, erhält man den Anreicherungsfaktor. Bei erfolgreicher Anreicherung spezifischer Phagenpartikel sollte dieser  $>1$  betragen (Sidhu et al, 2003). Berechnet man diesen auf Basis der zuvor ermittelten Zahlenwerte, zeigt sich auch hier, dass eine Anreicherung von 2,1 von der zweiten Runde zur dritten Runde stattfand. Eine Anreicherung von der ersten zu den folgenden Runden blieb aus (Abbildung 5, 4.1). Mögliche einflussnehmende Faktoren sollen folgend erläutert werden:

1. Waschstringenz
2. Auswahl des Helferphagen

Zu 1.: Eine zunehmende Waschstringenz von Runde zu Runde ist ohnehin in den vorgegebenen Waschprotokollen vorgesehen (3.1.3). Durch die kontinuierlich steigende Anzahl der Waschschriffe, sowie der zusätzliche Einsatz von 0,1 % Tween 20 (Polysorbat-20, nichtionisches Tensid) ab Runde zwei zu PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung), sollen nach und nach für eine Selektion von hochaffinen Bindern sorgen. Ein Begründung des zu hohen Output-Titers der ersten Runde und damit einer Selektion von eventuell vielen aber unspezifischen Phagen, könnten zu milde Waschkonditionen innerhalb der ersten Runde sein. Denkbar wäre auch hier schon der Einsatz von Tween 20 in einer 0,05 oder 0,1 % Konzentration und eine Steigerung der Konzentration von Tween 20 in den anschließenden Runden, die laut Barbas *et al.* bis auf 0,5 % angehoben werden kann (Barbas *et al.*, 2004). Parallel stellt eine Erhöhung der Anzahl der Waschschriffe oder ihrer Dauer, ohne Veränderung der Waschsubstanzen innerhalb der ersten Selektionsrunde einen realisierbaren Ansatz dar.

Zu 2.: In der ersten Selektionsrunde wurden M13K07 $\Delta$ pIII Hyperphagen verwendet, die für eine polyvalente Präsentation der scFv-AK am Phagenschwanz verantwortlich sind (1.3.3, 3.1.1). Die Antigen-AK-Bindung beruht hier nicht nur auf der intrinsischen Affinität einer Bindung, sondern auch auf der Avidität (Gesamtaffinität). Dies ist zu diesem Zeitpunkt der Selektion relevant, da jeder AK, somit auch potentiell AML-spezifische, nur zu einem geringen Anteil (<1 %) in der ursprünglichen Bibliothek repräsentiert ist (Smith und Petrenko, 1997). Eine denkbare Theorie ist, dass durch polyvalente AK-Präsentation innerhalb der ersten Runde zu viele unspezifische Klone diese Runde zu überdauern vermögen, was letztendlich in einem zu hohen Output-Titer resultierte. Denkbar wäre demzufolge, alle Selektionsrunden lediglich mit dem M13K07 Helferphagen durchzuführen, so wie es im Rahmen der Phage-Display-Technologie vor Entwicklung des Hyperphagen durch Rondot *et al.* standardisiert war (Rondot *et al.*, 2001).

Ein Anstieg des Anreicherungsfaktors von Runde zwei zu drei und der kontinuierlichen ebenfalls ansteigenden Absorptionswerte der einzelnen Runden im polyklonalen ELISA (4.2.1), weist auf eine erfolgreiche Anreicherung spezifischer Phagen hin, auch ohne, dass eine Anreicherung von der ersten zur zweiten Runde dokumentiert werden konnte. Dies bestätigt die alleinige quantitative Aussagekraft des Anreicherungsfaktors, sodass nur bedingt die unter 1. und 2. genannten Theorien realisiert werden sollten. Denn eine

zu stringente Selektion in der ersten Runde, könnte in einem Diversitätsverlust und dem Verlust spezifischer Binder resultieren (Smith und Petrenko, 1997; Sidhu et al., 2003).

Zu den beiden bereits zuvor erläuterten, einflussnehmenden Faktoren auf die Effizienz einer Selektion gehören weiterhin:

3. Anzahl der „panning“-Runden
4. Konzentration des Selektionsantigens

Zu 3.: Jarutat *et al.* (2007) konnten eine positive Korrelation zwischen der Rundenanzahl und der Anzahl der spezifisch-bindenden Klone registrieren (Jarutat et al., 2007). Während nach der 4. Runde 3,1 % aller getesteten Klone spezifische Bindung zum Selektionsantigen aufwiesen, waren es nach der 5. Runde bereits 25 %. Auch in anderen Studien zeigte sich dieser Zusammenhang (Sun et al., 2009; Jakobsen et al., 2007), sodass die Anzahl der durchgeführten Selektionsrunden in gängiger Fachliteratur zwischen zwei und fünf liegt und in den meisten Fällen drei „panning“-Runden durchlaufen werden (Barbas et al., 2004).

Nicht nur die positive Korrelation zwischen Anzahl der Selektionsrunden und der Affinität der Klone konnte gezeigt werden, sondern fatalerweise ebenfalls eine Anreicherung von AK-Fragmenten, die lediglich an Antigene, die in hoher Konzentration auf den Selektionszellen repräsentiert waren und nicht an das eigentliche Selektionsantigen banden (Larsen et al., 2015). Darüber hinaus konnte ebenfalls ein positiver Zusammenhang zwischen Rundenzahl und der Selektion von Klonen mit Wachstumsvorteilen, z.B. durch Stopcodons bedingt, dokumentiert werden, die mit spezifischen, affinen Klonen in direkter Konkurrenz stehen (Derda et al., 2001).

Unter Berücksichtigung der angeführten Aspekte wurde sich in vorliegender Arbeit für die Durchführung von drei Selektionsrunden entschieden. Dass drei Runden genügen um spezifisch-bindende Phagen anzureichern, verifizieren die Resultate des monoklonalen Phagen-ELISAs, in dem sich 56,8 % der analysierten Klone positiv zeigten (4.2.2). Ob aus einer Erhöhung der Anzahl der „panning“-Runden eine höhere Prozentzahl resultiert hätte, ist lediglich spekulativ.

Zu 4.: Durch eine kontinuierliche Verdünnung des Selektionsantigens von Runde zu Runde kann die Stringenz erhöht werden und der Fokus somit auf hochaffine Binder gerichtet werden (Liu et al., 2009; Fitting, 2012). Dies war im Rahmen vorliegender

Arbeit nicht durchführbar, da das Zielantigen vor der Selektion nicht bekannt war, sodass auf diese Variable zur Erhöhung der Stringenz verzichtet werden musste.

Der Vollständigkeit wegen seien noch weitere Faktoren, wie die Inkubationszeit, die Temperatur, pH-Konditionen und Phagen-Elution, die ebenfalls die Stringenz regulieren, erwähnt (Liu et al., 2009).

Abschließend sei noch eine weitere Selektionsstrategie, die die Effizienz einer Selektion zu steigern vermag, erwähnt. Lu und Sloan wechselten das Antigen von Selektionsrunde zu Selektionsrunde ab (Lu und Sloan, 1999). Durch Antigenpräsentation mittels immobilisiertem, aufgereinigtem Antigen und Antigenen in Lösung im Wechsel, konnte die Prozentzahl der spezifischen Binder im Vergleich zu Selektionen mit identischen Antigenpräsentationen gesteigert werden. In Anlehnung daran, wäre eine Abwechslung von FFPE-Material und PBMC's des gleichen AML-Patienten oder Kasumi-1 Zellen rundenübergreifend denkbar. Als weiterer Vorteil würden hieraus vergleichbarere Modalitäten von Selektion und initialer Charakterisierung resultieren. Dies soll eingehend in Kapitel 5.2.1 erläutert werden.

### 5.1.3 Die Depletion

Bevor der eigentliche Selektionsprozess im Rahmen einer Phage-Display-basierenden AK-Selektion durchgeführt wird, erfolgt zumeist eine „Negativ-Selektion“, die sogenannte Depletion (Watkins und Ouwehand, 2000; Shukla und Krag, 2015; Gur et al., 2009; Ruan et al., 2006). Ziel ist es, Phagen mit Bindungsaffinität zu irrelevanten, unspezifischen Epitopen zu reduzieren. Eine der ersten Beschreiber dieser Methode waren Parson *et al.* (1996), deren Ziel es war spezifische AK gegen Hämoglobin F zu generieren, wofür sie zuvor die Phagen auf Hämoglobin A in Lösung inkubierten (Parson et al., 1996). Es resultierten vier stark spezifische Klone gegen Hämoglobin F, weswegen die Methode der Depletion anschließend weiterentwickelt wurde und bis dato Anwendung findet.

Eine Depletion kann auf verschiedene Arten und Weisen durchgeführt werden. Eine Vielzahl an Protokollen mit unterschiedlichen Modalitäten ist beschrieben. Während Gur *et al.* die Negativ-Selektion beispielsweise direkt vor der eigentlichen Selektion mit identischen Bedingungen, sprich RT und Dauer (jeweils 2 h), umsetzten (Gur et al., 2009), inkubierten Shukla und Krag die Phagen über Nacht bei herabgesetzten Tempe-

raturen mit dem Negativantigen, um sie am darauffolgenden Tag auf das Selektionsantigen zu überführen (Shukla und Krag, 2005).

Beide Verfahren zeigten nach abgeschlossenen „panning“-Runden eine Anreicherung spezifischer AK-tragender Phagenpartikel gegen das Selektionsantigen. Allerdings kann durch zu große Unterschiede in anschließenden Analysemethoden oder zwischen den ursprünglichen Selektionsantigenen, kein direkter Vergleich und somit auch keine positive Korrelation zwischen Dauer und Erfolg einer Depletion dokumentiert werden. Daher entschloss man sich in vorliegender Arbeit, sich am zeitsparenden Protokoll von Gur und Kollegen zu orientieren (3.1.3).

Wie zuvor erläutert, stellt die Depletion ein adäquates Mittel zur Eliminierung unspezifisch-bindender AK-Fragmente in den Selektionsrunden dar. Bei Anwendung dieses Verfahrens muss man sich dennoch stets des Risikos, relevante scFv-präsentierende Phagen vor dem eigentlichen „panning“ zu entfernen, bewusst sein. Häufig präsentieren Ziel-Zellen Epitope auf ihrer Zelloberfläche, die zwar nicht völlig einzigartig für ihren Zelltyp sind, aber durch Überexpression dennoch ein nützliches Zielantigen darstellen könnten. Diese könnten bei einer Depletion verloren gehen und dadurch zukünftig nicht mehr berücksichtigt werden (Larsen et al., 2015).

Darüber hinaus werden meist AK-Bibliotheken, die auf Phagemiden basieren, wie auch die hier verwendete Tomlinson Bibliothek J, zur Selektion genutzt. Nach Phagenamplifikation präsentiert nur 1 bis 10 % aller Phagenpartikel überhaupt ein scFv-Fragment auf ihrer Oberfläche (Kay und Winter, 2008), sodass 90 bis 99 % aller Phagen nicht depletiert werden können und somit die Effektivität des Depletionsschrittes senken (Larsen et al., 2015).

Trotz dieser bekannten limitierenden Faktoren der Depletion, wurde auf Basis der überwiegend positiven Bewertung des Nutzens der Depletion in der Fachliteratur, diese vor den „panning“-Runden in vorliegender Arbeit durchgeführt.

Watkins *et al.* dokumentierte den höchsten Selektionserfolg durch Nutzung tumorfreier Zellen des Ursprungsgewebes der entsprechenden Tumorentität (Selektionsantigen) (Watkins und Ouwehand, 2000). Analog dazu wurden zur Depletion in vorliegender Arbeit FFPE-Schnitte eines malignom- und infiltratfreien Beckenkammtrepanats mit morphologisch normentsprechend ausreifender Hämatopoese (Beurteilung durch einen Facharzt der Pathologie) ausgewählt.

Es ist nachgewiesen, dass Phagen eine generelle Bindungsaffinität zu Plastik aufweisen (Qiang et al., 2017). Im Rahmen des Phage-Displays macht man sich diese Eigenschaft sogar unter Verwendung von PEG/NaCl zur Trennung der produzierten Phagen von den  $F^+$ -*E. coli* am dritten Tag einer Selektionsrunde zu Nutze (3.1.1). Diskutiert werden kann daher ein zusätzlicher Depletionsschritt auf Plastikpartikeln wie er unter anderem von Shukla und Kollegen durchgeführt wurde (Shukla et al., 2015). Unter Standardselektionsbedingungen mit immobilisierten Antigenen auf Plastikoberflächen (1.3.5) ist dieser Teilschritt sicherlich sinnvoll. Bei der On-Slide Selektion, in der die Antigene auf Glasoberflächen in Form von Objekträgern immobilisiert sind, ist es ausgeschlossen, dass die scFv-präsentierenden Phagen mit Plastik in Berührung kommen und so unspezifisch bindende, lediglich plastikaffine Phagen selektioniert werden. Dass man durch Verwendung von FFPE-Gewebe diese oft beschriebene Problematik tatsächlich umgehen und einen weiteren Depletionsschritt überspringen konnte, verifizieren die Ergebnisse des polyklonalen ELISA. In der Kontrolle der Kreuzreaktivität konnten signifikant erhöhte Absorptionswerte auf Plastik ausgeschlossen werden (4.2.1).

Der Erfolg der durchgeführten Depletion in vorliegender Arbeit kann lediglich indirekt über Analysen der Kreuzreaktivität der selektionierten Klone abgeschätzt werden. Eine Testung der Kreuzreaktivität wurde in allen Charakterisierungsschritten und Bindeanalysen mitgeführt und soll in Kapitel 5.2.4 eingehend besprochen werden.

Abschließend bleibt festzuhalten, dass eine von Larson *et al.* 2015 neu entwickelte Technologie, künftig eine Minimierung der Depletionsschritte oder eventuell sogar den vollständigen Verzicht der Depletion bei der Selektion auf FFPE-Gewebe bedeuten könnte (Larsen et al., 2015). Bei dieser neuartigen Technologie werden Phagen mit Bindungsaffinität zu ubiquitär vorhandenen und irrelevanten Epitopen durch den Einsatz von Ultraviolettstrahlung (UV) der Wellenlänge 254 nm (UV-C) zerstört. Die UV-C Strahlen führen zu Quervernetzungen innerhalb der ss-DNA der Phagen, wodurch die Reproduzierbarkeit der Phagen durch ihren Wirt (z.B.  $F^+$  *E. coli*) deutlich gesenkt wird (Kurosaki et al., 2003). Die Selektionsantigen-positiven Zellen werden mittels Fluoreszenzmikroskopie zuvor biomarkiert, sodass ein exakt über den Zellen platzierter „shadow stick“ diese während der UV-Strahlung bedeckt und somit spezifisch gebundene Phagen vor einem Viabilitätsverlust schützt. Die Resultate der Studie dokumentierten die Effektivität dieser neuartigen „shadow stick-Selektion“,

sodass diese als vielversprechende zukünftige Alternative zur Depletion im Rahmen der Selektion auf FFPE-Material gelten kann. Voraussetzung hierfür ist jedoch die Kenntnis über das Zielantigen sowie die Möglichkeit dieses zu detektieren.

## 5.2 Identifizierung und Charakterisierung der selektionierten Binder

Wie die Auswahl exklusiver Klone nach den „panning“-Runden erfolgte und die daraus resultierenden Ergebnisse der Bindungsanalysen hinsichtlich Affinität und Spezifität, sollen in folgenden Kapiteln diskutiert werden.

### 5.2.1 Initiale Charakterisierung

Zur initialen Charakterisierung und somit zur Auswahl einzigartiger AML-spezifischer Binder im Anschluss an den Selektionsprozess, wird in den meisten publizierten Studien ein Phagen-ELISA durchgeführt (Barbas et al., 2004; Janeway et al., 2009). Zur Identifikation wurden in vorliegender Arbeit die Bindeaktivitäten 88 gepickter Klone auf Membranfragmenten der Kasumi-1 Zelllinie im Rahmen eines monoklonalen ELISAs getestet. Bei Kasumi-1 handelt es sich um eine Zelllinie, die auf periphere Blutzellen eines an AML erkrankten Jungen zurückzuführen ist (Asou et al., 1991). Sie lässt sich dem Subtyp M2 zuordnen und besitzt die  $t(8;21)(q22;q22)$  Chromosomentranslokation (1.1.3), die in 40 % aller Erkrankungen dieses Subtyps gefunden werden kann (Peterson und Zhang, 2004). Darüber hinaus exprimieren Kasumi-1 Zellen den Stammzellmarker CD34 und myeloische Oberflächenmoleküle wie CD13, CD33, CD38 und HLA-DR (Larizza et al., 2005).

In dem Großteil der im Rahmen der Diskussion bereits vorgestellten Studien, wurden sowohl die Selektion, als auch die initiale Charakterisierung auf Antigenen gleicher Beschaffenheit und Herkunft durchgeführt. Als Beispiel wäre hier die Studie von Fitting anzuführen, die auf Kasumi-1 Zellen selektierte und diese auch im Phagen-ELISA verwendete (Fitting, 2012). Obwohl in vorliegender Arbeit eben diese Zelllinie passend zum Subtyp des AML-Patienten (M2), dessen Beckenkammbiopsie als Basis der On-Slide Selektion diente, ausgewählt wurde, konnten keine identischen Bedingungen in Selektion und der anschließenden Identifikation spezifischer Binder geschaffen werden. Es darf hinterfragt werden, ob das unbekannte Zielantigen, sowohl auf dem *ex vivo*-



Material und den artifiziellen Zelllinien - in gleichem Maße - exprimiert ist oder es sich um ein Isotypen-spezifisches Epitop handelt (Arap et al., 2002).

Alternativ wäre eine Analyse und Auswahl spezifischer Binder im Rahmen einer Immunhistochemie denkbar, sodass Selektion und initiale Charakterisierung unter höchst vergleichbaren Modalitäten abliefen. Jarutat *et al.*, die die Selektion ebenfalls auf Basis von FFPE-Gewebe durchführten, schlossen ebenfalls IHC-Methoden an die Selektion an (Jarutat et al., 2007). Zur simultanen Abarbeitung zahlreicher Proben, vergleichbar mit den annähernd 100 Klonen, die auf einer Mikrotiterplatte im Phagen-ELISA analysiert werden können, ist die Verwendung von Tissue Microarrays (TMA) potentiell möglich. Das TMA stellt ein Verfahren in Anlehnung an Hochdurchsatz-Screening Methoden dar, mit dem bis zu 1000 Gewebeprobe auf einem Objektträger parallel getestet werden können (Kallioniemi et al., 2001). Zur Herstellung werden Gewebezyylinder von 0,6 bis 2 mm Durchmesser aus einer paraffinierten Gewebeprobe (Donorblock) gestanzt und in einen vorbereiteten Paraffinblock (Empfängerblock) überführt. Bis zu 1000 solcher Gewebezyylinder können in den Empfängerblock eingesetzt werden, von welchem mit einem Mikrotom, je nach dessen Dicke, bis zu 100 Schnitte angefertigt werden können. Nicht nur validere Daten durch Erhöhung der Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der Resultate sondern auch eine Verbrauchsmaterialersparnis, sind als positive Eigenschaften zu nennen (Luttmann, 2014).

So könnten beispielsweise 100 Klone der Selektion auf bis zu 1000 Gewebeprobe, hergestellt aus nur einem Empfängerblock, auf ihre Bindeeigenschaften analysiert und entsprechend ausgewählt werden. Sinnvoll ausgewählte Gewebeprobe von beispielsweise unterschiedlichen AML-Patienten sowie Subtypen, malignomfreies Knochenmark und diverse gesunde Organe wären denkbar. Hierzu müsste eine sehr große Anzahl gepickter Klone in Fab-Fragmente umgewandelt werden, da diese eine höhere thermodynamische Stabilität als scFv-Fragmente aufweisen und somit besser für diese Art der Analysen geeignet sind (Kramer, 2002). Dies entspräche einem enormen Arbeitsaufwand (vgl. 3.6.1). Sollte man sich zur initialen Charakterisierung mittels TMA entscheiden, wäre es dementsprechend sinnvoller eine Phage-Display-Bibliothek, im Fab-Antikörperfragment Format, statt den Tomlinson Bibliotheken im scFv-Format, für die Selektion auszuwählen.

Vor allem der zuvor genannte Aspekt der Reproduzierbarkeit scheint in vorliegender Arbeit von besonderem Interesse zu sein. Im ersten durchgeführten monoklonalen ELISA konnte von 56,8 % der gepickten Klone ein positives Bindeverhalten hinsichtlich Kasumi-1 MF dokumentiert werden. Dies entspricht einem häufig publizierten Prozentwert: meist konnten 10 - 50 % der Klone im Anschluss an die Selektion im ELISA positiv getestet werden konnten (Marcus et al., 2006; Rondot et al., 2001). Die 20 Klone mit den höchsten Absorptionswerten wurden erneut monoklonal analysiert, von denen lediglich 4 erneut positiv getestet werden konnten, was einem prozentualen Anteil von 20 entspricht. Bei identischen Bedingungen hinsichtlich Antigenverdünnung, Inkubationszeiten, Verbrauchsmittel-Verwendung, Detektion der Bindungen (mittels TMB, jeweils 5 min) und Messen der Absorptionswerte, lässt sich ein Fehler in der Produktion scFv-präsentierender Phagenpartikel vermuten. Denkbar wäre eine fehlerhafte DNA-Replikation der Fusionsproteine oder mangelnder Zusammenbau (Assemblerung) der Phagenbestandteile, sodass keine oder Phagenpartikel ohne scFv-Fragment an ihrem pIII Hüllprotein entstanden sein könnten (Barbas et al., 2004). Ebenfalls potentiell mögliche Theorien wären der Verlust von Antigen-AK-Komplexen durch die diversen Waschschriffe oder eine Denaturierung der Proteine an der Plastikoberfläche der Mikrotiterplatte, sodass eine Epitopzugänglichkeit der MF nicht mehr gewährleistet sein konnte (Luttmann, 2014).

Abschließend sei erwähnt, dass bei einem in beiden monoklonalen ELISAs identifizierten Klon (A10), sowohl auf PBMC's als auch auf BSA, eine hohe Kreuzreaktivität beobachtet werden konnte. Es wurde sich daher für eine weitere Charakterisierung der drei AML-spezifischsten Klone entschieden (B4, G2, H5) (4.2.2). Anschließende Analysen des Bindungsverhaltens zeigten, dass diese verbliebenen drei Klone eine AML-spezifische Bindeaktivität aufwiesen (4.3, 4.4), deren Affinität und Kreuzreaktivität soll in den anschließenden Kapiteln diskutiert werden.

### 5.2.2 Ortsgerichtete Mutagenese

Die *E. coli* Bakterien (TG1), die zur Phagen-Amplifikation während der Selektion genutzt wurden, können als Suppressorstamm bezeichnet werden. Diese können das amber Stopcodon (TAG), das zwischen den codierenden Sequenzen für scFv und pIII lokalisiert ist (1.3.2) überlesen, supprimieren die eigentliche Termination und übersetzen es mit der Aminosäure Glutamin. Das Stopcodon TAG lässt sich auf

Herstellung der hohen Diversität der Tomlinson J Bibliothek mittels NNK Zufallsnukleotiden zurückführen (Tomlinson, I. - Tomlinson Manual). Geht man von einer Binominalverteilung aus, ist eine 43,59 % Wahrscheinlichkeit gegeben, dass mindestens ein Klon der Bibliothek J ein Stopcodon aufweist (Marcus et al., 2006). Obwohl daher nur eine statistische Wahrscheinlichkeit von weniger als 50 % besteht, einen Klon mit Stopcodon zu selektionieren, konnte dennoch bei drei von vier nach dem monoklonalen ELISA sequenzierten Klonen ein Stopcodon nachgewiesen werden, was einem Anteil von 75 % entspricht. Hierbei handelt es sich um ein in publizierten Daten häufig beobachtetes Phänomen. Meist lässt sich in 10 – 30 % aller selektionierten Klone ein Stopcodon nachweisen, in einigen speziellen Selektionsprozessen konnte bisweilen eine Prozentzahl von 70 – 100 % dokumentiert werden (Barderas et al., 2006; Wu et al., 2007). Suppressor-Stämme translatieren in 20 % der Fälle das Stopcodon als Glutamin und in 80 % als tatsächliches Stopp-Signal, sodass hieraus in der überwiegenden Anzahl der Fälle eine Produktion von kleineren Proteinen resultiert. Diese besitzen eine geringere Zytotoxizität, wodurch diese Klone bevorzugt amplifiziert werden. Dies stellt eine mögliche Erklärung für den hohen prozentualen Anteil der selektionierten Klone mit Stopcodon sowohl in bereits publizierten Daten, als auch in Daten der vorliegenden Arbeit dar (Marcus et al., 2006).

Zur Produktion löslicher AK (scFv-Fc Fusionproteine und Fab-Fragmente) durch eukaryotische und prokaryotische Zellen (non-Suppressorstämme), war eine ortsgerichtete Mutagenese des amber Stopcodons notwendig, da diese nicht über die Fähigkeit zur Supprimierung der Termination verfügen.

Eine Sequenzierung im Anschluss dokumentierte eine korrekt durchgeführte Mutagenese. Das TAG Stopcodon der Klone B4 und G2 konnte erfolgreich in Glutamin ummutiert werden (4.3.1). Bei H5 ließ sich kein Stopcodon nachweisen, weswegen hier der Prozess der Mutagenese übersprungen werden konnte.

### 5.2.3 Bindeaktivitäten der selektionierten Klone in unterschiedlichen Antikörperformaten

Die drei identifizierten exklusiven Klone sollten in verschiedenen AK-Formaten charakterisiert werden. Dazu wurden diese in scFv-Fc Fusionsproteine (ca. 57 kDa) und in Fab-Fragmente (50 kDa) umgewandelt. Obwohl es sich bei beiden AK-Formaten um kleine Fragmente handelt, besitzen sie dennoch die vollständige monovalente Bindungsaffinität eines Volllängenantikörpers (IgG, ca. 150 kDa) (Hudson, 2000). Im

Rahmen eines eventuellen späteren diagnostischen oder therapeutischen Einsatzes, weisen diese günstige Eigenschaften im direkten Vergleich zu einem Volllängenantikörper auf. Zu nennen wären hier eine bessere Penetration von soliden Tumoren sowie eine gute Eliminierung aus dem Blut über die Nieren aufgrund ihrer geringeren Proteingröße (Colcher et al., 1999). Darüber hinaus fehlen den Fab-Fragmenten die Fc-Fragmente, sodass keine Fc-Rezeptoren auf Oberflächen gebunden werden können und das Fragment lediglich Bindungen mit Antigenen über seine eigentliche Bindedomäne eingeht. Dies verspricht weniger unspezifische Hintergrundsignale in Bindungsanalysen (Luttmann, 2014).

Die scFv-DNA der drei Klone wurde zur eukaryotischen Produktion von löslichen scFv's in einen eukaryotischen Expressionsvektor pMS2, in dem die Expression über ein Cytomegalievirus-Promotorsystem reguliert wird, umklontiert (Moriya, 1993). Innerhalb dieses Vektors ist der für das scFv-Fragment codierende Sequenz eine Maus Immunoglobulin konstante Domäne nachgeschaltet, sodass es beim Ablesen der Expressionskassette zur Herstellung von scFv-Fc Fusionsproteinen kommt und diese zwei Antigenbindungstellen enthalten (bivalente Bindung). Der murine Fc-Teil des Fusionsproteins, der aus CH2, CH3 (konstante Regionen der schweren Kette) und der Hinge-Region (Gelenkregion), besteht dient der Detektion der AK durch standardisierte anti-Maus Sekundär-AK (z.B. gam-FITC) und erlaubt somit den Nachweis des vollständigen scFv-Fc Fusionsproteins fluorimetrisch mittels Durchflusszytometrie. Die Herstellung wurde durch die humane Zelllinie HEK 293T realisiert. Eine prokaryotische Herstellung löslicher scFv-Fusionsproteine ist ebenfalls beschrieben und kann beispielsweise durch die non-Suppressor *E. coli* Stämme HB2151, BL21(DE3) oder C41(DE3) erfolgen (Miroux und Walker, 1996). Neben den zuvor erwähnten Vorteilen der Bivalenz und der fluorimetrischen Detektierbarkeit der Fusionsproteine, verfügen diese aufgrund der Dimerisierung über eine höhere Stabilität und Affinität als herkömmliche scFv-Fragmente (Moutel et al., 2009).

Für weitere Analysen auf FFPE-Gewebe wurden Fab-Fragmente eingesetzt, die durch Disulfidbrücken und die konstante Region vergleichsweise nochmals (thermodynamisch) stabilere Eigenschaften als scFv-Fragmente aufweisen (Nieba et al., 1997; Kramer, 2002). Deren Herstellung wurde durch prokaryotische Expression durch den non-Suppressorstamm BL21(DE3) realisiert. Die codierenden Sequenzen für V<sub>H</sub> und V<sub>L</sub> wurden abermals in einen Expressionsvektor, pMT2 (abgeleitet aus pET27b Vektor von

Novagen (Fitting, 2012)), in dem die Expression über ein T7-Promotorsystem reguliert wird, kloniert. Eine Detektion in allen Fab-Analysen erfolgte über das Streptavidin-Biotin-System.

Zur Vergegenwärtigung der Ergebnisse der analysierten Klone und zur anschaulicheren Diskussion, seien die Resultate dieser Arbeit in folgender Tabelle gegenübergestellt.

**Tabelle 14: Tabellarische Gegenüberstellung der Bindungsaktivität der identifizierten Klone in verschiedenen AK-Formaten auf Positivantigenen**

Als Positivantigene dienten Kasumi-1 Zellen, als MF im Rahmen der ELISA-Analysen und in Form von vitalen Zellen bei den durchflusszytometrischen Analysen. IHC- und IF-Analysen wurden auf FFPE-Gewebe von AML-Patienten durchgeführt. Einteilung der Bindestärke im Rahmen des ELISA nach Absorptionsstärke: + = 10-100-mal über dem Hintergrundsignal, ++ = 100-200-mal, +++ >200-mal, im FACS nach Zellverschiebung in %, + = 20-50 %, ++ = 50-70 %, +++ = >70 %, Ø = <20 % und bei den IHC- und IF-Analysen nach Färbeintensität: + = schwach, ++ = moderat, +++ = stark. Die Immunfluoreszenz-Analysen wurden exemplarisch nur mit Klon H5 durchgeführt. Die Bindungsaktivität der scFv-Fc Fusionsproteine wurde zusätzliche auf PBMC's, die aus drei AML-Patienten isoliert wurden, analysiert. Exemplarisch ist hier Patient 3 aufgeführt, auf dem eine schwache Bindung nachgewiesen werden konnte.

	scFv-Phagen	scFv-Fc Fusionsproteine		Fab-Fragmente		
	ELISA	FACS	FACS (PBMC's AML)	FACS	IHC	IF
<b>B4</b>	+	++	+	+++	+	/
<b>G2</b>	+	+++	+	++	++	/
<b>H5</b>	+	+++	Ø	+++	+++	++

Eine Bindeaktivität, der mittels On-Slide Selektion isolierten Binder, lässt sich sowohl auf vitalen Zellen der Zelllinie Kasumi-1 (FACS), als auch auf fixiertem FFPE-Gewebe (IHC, IF) nachweisen. Dies deutet auf ein Epitop als Selektionsantigen hin, welches auf *ex vivo* Material, sowie auch auf Zellen artifiziellen Ursprungs vorhanden sein muss. Darüber hinaus beweist das Bindungsverhalten die Paraffingängigkeit der isolierten Klone (5.1.1).

Allerdings sei erwähnt, dass es sich bei FACS-Analysen um objektivierte Messmethoden handelt, während eine Beurteilung von IHC- und IF-Resultaten subjektiver Bewertungsmaßstäbe unterliegt und somit einen direkten Vergleich der Analysemethoden und deren Ergebnisse erschwert. Wagt man dennoch eine Gegenüberstellung und möchte ein Fazit ziehen, so lassen sich die erzielten Ergebnisse übergeordnet als heterogenes Resultat beschreiben. Keiner der getesteten Klone weißt über alle AK-Formate und Analysemethoden hinweg eine homogene Bindeaktivität auf. Dennoch scheint eine Einteilung von H5 als hochaffinen, G2 als moderaten und B4 als eher

schwächeren Binder sinnvoll (Tabelle 14). B4 wies lediglich eine moderate Bindeaktivität der scFv-Fusionproteine in den FACS-Analysen und wenige spezifische Färbungen durch DAB auf den verschiedenen AML-Beckenkammtrepanaten in der IHC auf. H5 hingegen wies sowohl starke Bindeeigenschaften (Zellverschiebung in % > 70) in den FACS-Färbungen mit beiden AK-Formaten, als auch in der IHC auf. Eine Abstufung der Blastenfärbung mittels DAB korrelierte darüber hinaus hierbei positiv mit dem Blastenanteil der Beckenkammtrepanate (4.4.3). Die hochaffine Bindestärke lässt sich mit dem Fakt unterstreichen, dass sich H5 in Selektion und initialen Charakterisierung durchsetzen konnte, obwohl in den codierenden Sequenzen kein Stopcodon nachgewiesen werden konnte, was als möglicher Selektionsvorteil gilt (5.2.2), der bei den weiteren isolierten Bindern nachgewiesen wurde.

Wie Tabelle 14 zu entnehmen ist, wurden unterschiedliche Bindungsstärken der Klone B4 und G2 in verschiedenen AK-Formaten im Rahmen der Durchflusszytometrie (FACS) gemessen. Mögliche Begründungen sollen wie folgt aufgezeigt werden:

- Die Synthese und Assemblierung der scFv-Fc Fusionsproteine findet im Endoplasmatischen Retikulum der eukaryotischen Zelle statt. Die Herstellung der Fab-Fragmente wurde durch *E. coli* Bakterien realisiert. Verändert man das AK-Format hat dies ebenfalls Einfluss auf die Faltung des AK-Proteins, wodurch es zur fehlerhaften Assemblierung gekommen sein könnte, die sich auf die spezifische Bindungsstärke des AK auswirkte (Mayer, 2003). Hinzu kommt, dass sich gemessene Daten verschiedener AK-Formate in mehreren FACS-Analysen ebenfalls nur schwer miteinander vergleichen lassen, da die Detektion der Bindung mittels unterschiedlicher Sekundär-AK realisiert wurde (FITC und Streptavidin-Biotin-System).
- Da die FACS-Analysen zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt wurden, konnte demnach auch nicht mit Kasumi-1 Zellen der identischen Passage getestet werden. Es konnte beobachtet werden, dass artifizielle Zelllinien nach mehreren Passage-Schritten und längerer Zeit in Kultivierung zu Veränderungen ihrer Oberflächenmoleküle neigen (Tur et al., 2003; Arap et al., 2002). Das unbekannte Zielepitop könnte auf den genutzten Zellen somit unterschiedlich stark exprimiert sein, sodass die Unterschiede des Bindungssignals in den durchflusszytometrischen Messungen darauf zurückzuführen sein könnten.

Eine starke Abweichung zu den zuvor erzielten FACS-Resultaten auf Kasumi-1 Zellen, wurde mit den Analysen auf PBMC's von AML-Patienten dokumentiert. Aufgrund der gezielten Gewebeauswahl des Selektionsgewebes nach spezifischen Kriterien (5.1.1), handelte es sich hierbei um FFPE-Material, das seit mehreren Monaten archiviert vorlag, sodass keine Möglichkeit bestand, FACS-Analysen mit Blutproben des identischen Patienten durchzuführen. Eine Annäherung an vergleichbare Analyse-Modalitäten gelang durch ein Angleichen des Subtyps, sodass PBMC's von drei Patienten mit AML M2 ausgewählt und analysiert wurden (4.3.5). Bei zwei von drei Patienten konnte kein Bindesignal aller drei Klone nachgewiesen werden, die prozentuale Zellverschiebung lag zumeist sogar unter 10 %. Lediglich bei Patient 3 konnte ein schwaches Bindesignal ausgerechnet der moderat- und schwachbindenden Klone B4 und G2 dokumentiert werden. Bei dem in den anderen Analysen hochaffinen Binder H5 konnte lediglich eine prozentuale Zellverschiebung von 14,37 % beobachtet werden. Dies entspricht weniger als einer schwachen Bindeaffinität (>20 %). Da gezeigt werden konnte, dass die drei Binder sowohl eine artifizielle AML-Zelllinie als auch klinisches *ex vivo*-Material in Form von FFPE-Gewebe in der IHC (In situ-Immunlokalisierung auf Zellen im Gewebeverband) erkennen konnten, scheint es paradox, dass *ex vivo*-Material in Form von PBMC's der AML-Patienten nicht gebunden werden konnten. Mögliche Deutungen dieser Resultate könnten sein:

- Die PBMC's der drei Patienten lagen in kryokonservierter Form bei ca. -196 °C in flüssigem Stickstoff für ca. ein Jahr vor, bevor sie für die Analysen erneut in Kultur genommen wurden. Bathnagar *et al.* zeigten, dass der Prozess des Einfrierens und Wiederauftauens irreversible Schäden an Proteinen auslösen kann, wodurch es zu einem Strukturverlust, einer Änderung der Konformation und nicht zuletzt der biologischen Aktivität der Epitope gekommen sein könnte (Bhatnagar et al., 2007).
- Eine Vielzahl an Progenitorzell- und Differenzierungsmarkern in Form von CD-Molekülen, die auf AML-Blasten exprimiert werden und den leukämieassoziierten Immunphänotyp bestimmen, sind bereits bekannt, weswegen die AML auch als polymorphe und polygenetische Erkrankung beschrieben wird (Mrozek et al., 2004). Denkbar ist, dass es sich bei den Oberflächenmarkern, der in vorliegender Arbeit getesteten PBMC's um Isotypen-spezifische Epitope handelt, gegen die keiner der drei isolierten Binder gerichtet ist. Da das Zielantigen der drei Binder bis dato nicht bekannt ist, stellt dies einen möglichen Erklärungsansatz der fehlenden

Bindungen im Rahmen der durchgeführten FACS-Analysen dar. B4 und G2 könnten gegen ein Antigen gerichtet sein, das auf Patient 3 schwach exprimiert ist, was wiederum deren schwache Bindung zur Folge hatte. Da H5 auch die peripheren Blutzellen dieses Patienten nicht erkannt hatte, scheint dieser gegen ein völlig anderes (Isoypten-spezifisches) Epitop gerichtet zu sein, das jedoch sowohl auf Kasumi-1, als auch auf dem FFPE-Gewebe des Selektionspatienten exprimiert sein muss.

Die Immunfluoreszenzanalysen wurden exemplarisch mit dem affinsten Binder H5 durchgeführt. Ziel hierbei war es, durch fluoreszierende Immunglobuline gebundene AK zu detektieren (indirekte Immunfluoreszenz) (Janeway et al., 2009) und somit Oberflächenmarkierungen einzelner Zellen und eine Doppelmarkierung von Blasten durch den Binder H5 und einen Anti-CD34 Primär-AK sichtbar zu machen (Donaldson, 2015; Mason et al., 2000; Bataille et al., 2006). Ein Parameter, der die Qualität der IF-Analysen negativ beeinflussen könnte, wie die häufig beschriebene Autofluoreszenz des Gewebes durch mehrere übereinanderliegende Zellschichten (Davis et al., 2014), wurde durch Anfertigung sehr dünner Schnitte 0,5 µm (statt 3-4 µm) minimiert (Robertson et al., 2008). Damit sollte ebenfalls die Detektion/Lokalisation einzelner Zellen verbessert werden.

Eine zuvor beschriebene Doppelmarkierung gelang ausschließlich auf dem FFPE-Knochenmarksbiopsat des AML-Patienten und nicht auf dem gesunden Beckenkammpreparat (Abbildung 19, A/CD34), was demzufolge eine spezifische Bindung des getesteten Klons an der Oberfläche der Myeloblasten dokumentierte. Keine Doppelmarkierungen konnten hingegen auf dem AML-FFPE-Gewebe und den gesunden Knochenmarkbiopsaten durch H5 und kommerziell erhältlichen Oberflächenmarkern beider hämatopoetischer Vorläuferzellreihen (GYPC, CD61, CD68, CD20 und CD3) beobachtet werden, was die These einer hochaffinen und spezifischen Blastenbindung von H5 bestätigt.

Wie durch die IHC-Färbungen aufgezeigt wurde, stellte die reine Entparaffinierung das Vorbehandlungsverfahren zum Erzielen optimaler Färbeergebnisse der selektionierten Klone dar (4.4.3). Die verwendeten Standard-Oberflächenmarker benötigen jedoch hitzeinduzierte oder proteolytische Methoden der Antigendemaskierung, sodass keine identischen Bedingungen für eine optimale Bindung, sowohl der Routine-AK, als auch des selektionierten Binders parallel gewährleistet werden konnten. Nach einigen



Vorversuchen (Daten nicht gezeigt) entschied man sich schließlich, die Methoden der Antigendemaskierung der kommerziell erhältlichen Oberflächenmarker nach Angaben des Herstellers zu berücksichtigen und das FFPE-Gewebe mit EDTA-, Citrat-Puffer und Proteinase K (je nach AK) vorzubehandeln. Dies könnte die gezielte Bindung der Fab-Fragmente an die Blasten negativ beeinflusst haben. Eine eher schwache Anfärbung der Blasten auf den Beckenkammtrepanaten des AML-Patienten, auf denen eine etwaige Doppelmarkierung mit CD 61, 20 und 3 widerlegt werden sollte, könnte hieraus resultiert sein. Diese These unterstützen die Färbungen mit Fab-Fragmenten und GYPC. Dieser Marker benötigt für optimale Färberesultate ebenfalls keine Vorbehandlung, sodass hier das bestmögliche Ergebnis gelingen konnte: ein Nebeneinander von GYPC- und Fab-markierten Zellen ohne Doppelmarkierungen wurde beobachtet. Diese fehlende Doppelmarkierung dokumentiert eindeutig eine spezifische, hochaffine Blastendetektion durch ausbleibende Markierung erythropoetischen Vorläuferzellen durch den Klon H5. Eine Bindung des selektierten Klons an weitere Zellen der myeloischen Reihe (wie Monozyten, Makrophagen und Thrombozyten), sowie der lymphatischen Reihe (B- und T-Zellen), konnte in der Analyse der IF in vorliegender Arbeit somit nur unter Vorbehalt widerlegt werden.

Einige Hinweise deuten darauf hin, dass es sich beim unbekanntem Zielantigen um CD34 handeln könnte. In der IF konnte nachgewiesen werden, dass die Myeloblasten von H5 im Fab-Format erkannt worden sind. Es war zuvor bekannt, dass das genutzte FFPE-Material in der Routine-AML-Diagnostik immunhistochemisch positiv für CD34 getestet wurde. Bei den IHC-Analysen in vorliegender Arbeit wurde jenes Gewebe ebenfalls verwendet, wobei auch eine spezifische Bindung durch H5 detektiert werden konnte (4.4.3). Der Fakt, dass CD34 nicht nur ein häufiges AML M2-assoziiertes Epitop darstellt (Khalidi et al., 1998), sondern ebenfalls auf Kasumi-1 Zellen exprimiert wird (Larizza et al., 2005), an die H5 in allen FACS-Messungen stark gebunden hat, untermauert diese These. Da die Klone B4 und G2 nicht mittels Immunfluoreszenz analysiert wurden, kann über deren Zielantigen keine Theorie aufgestellt werden.

#### 5.2.4 Kreuzreaktivität

Unter Kreuzreaktivität versteht man die Eigenschaft von Antikörpern, neben dem für sie spezifischen Antigen auch andere Antigene zu binden. Zur Ausbildung einer Kreuzreaktivität genügt bei AK mit niedriger Affinität oftmals lediglich eine

Epitopähnlichkeit (Tsumoto und Caaveiro, 2016; Luttmann, 2014). Als Beispiel sei der Anti-Steroid-Progesteron (DB3) AK genannt, der mit etlichen anderen Steroiden ebenfalls interagiert und diese als Epitope zu erkennen vermag (Arevalo et al., 1993).

Zur Überprüfung der Kreuzreaktivität und damit des Nachweises der Spezifität der isolierten Binder, wurde in vorliegender Arbeit im Rahmen aller Analysen ein Negativantigen mitgeführt.

Im Rahmen der ELISA-Analysen dienten Plastik und BSA, ein irrelevantes Protein, zur Überprüfung der Spezifität auf Phagen-Ebene. Wie zuvor erläutert, weisen Bakteriophagen generell eine hohe Affinität zu Plastik auf (3.1.1, 5.1.3). Durch die On-Slide Selektion auf Glasobjektträgern, wurden erfolgreich scFv-Phagenbinder, ohne Affinität zu Plastik generiert (4.2.1, 5.1.2). Im polyklonalen ELISA zeigte sich allerdings zu parallel ansteigenden Messwerten auf Kasumi-1 von Runde zu Runde auch eine unspezifische Bindeaktivität auf BSA. Bei BSA handelt es sich um ein Proteingemisch, das aus Rinderplasma gewonnen wird. Diese unspezifische Bindung konnte in der anschließenden Analyse im monoklonalen ELISA widerlegt werden (4.2.2, Abbildung 8/B), sodass im Rahmen des polyklonalen ELISA tatsächlich von einer unspezifischen Bindung, beispielsweise durch den Phagenkörper an sich, ausgegangen werden kann.

Wie zuvor beschrieben wies der Klon A10 in beiden monoklonalen ELISAs eine zu hohe Kreuzreaktivität auf zuvor vorgestellten Negativantigenen auf, weswegen dieser in den anschließenden Charakterisierungsschritten nicht mehr berücksichtigt wurde.

In allen durchflusszytometrischen Analysen wurden PBMC's und die Zelllinie NALM-6 zur Detektion einer etwaigen Kreuzreaktivität eingesetzt. PBMC's sind mononukleäre Zellen des peripheren Blutes, die aus humanem Vollblut eines gesunden Menschen isoliert wurden (3.4.5). Diese bestehen vor allem aus Lymphozyten und Monozyten, da Erythrozyten, polymorphkernige Leukozyten oder Granulozyten zuvor abgetrennt werden (Janeway et al., 2009). Das heißt durch Analysen mit PBMC's konnte eine Kreuzreaktivität sowohl zu Zellen aus der lymphatischen, als auch der myeloischen Reihe überprüft werden. Zur weiteren Überprüfung der Spezifität wurde bewusst die Zelllinie NALM-6 ausgewählt, da es sich bei jener ebenfalls um Zellen einer akuten Leukämie (ALL), präziser der Vorläufer B-Zell-Leukämie handelt (Romano et al., 2009). Darüber hinaus würde ein potentiell therapeutischer Einsatz der selektionierten

Binder über die Applikation ins Blutssystem, sprich intravenös, erfolgen (Gasiorowski et al., 2014), sodass eine mögliche Interaktion zu diversen Blutzellen auch im Hinblick auf diesen Aspekt von Interesse ist.

In den FACS Analysen, die mit den scFv-Fc Fusionsproteinen durchgeführt wurden, zeigten alle Klone im direkten Vergleich zu Kasumi-1 mit den beiden Negativantigenen mindestens einen hohen, meistens sogar einen höchst signifikanten Unterschied, sodass hier keine Kreuzreaktivität dokumentiert werden konnte. Eine Kreuzreaktivität der Fab-Fragmente G2 und H5 konnte ebenfalls nicht beobachtet werden. Beim hochaffinen Binder H5 zeigten sich zudem höchst signifikante Unterschiede der gemessenen Zellverschiebung vom Positivantigen zu den beiden Kontrollen in Form von PBMC's und NALM-6. Obwohl durch den Klon B4 in den FACS-Analysen mit den scFv's keine unspezifischen Bindungen auf den Negativantigenen nachgewiesen werden konnten, zeigte sich bei jenen im Fab-Format zu NALM-6 Zellen eine schwache und zu PBMC's eine schwach bis moderate Bindung. Wie im vorherigen Kapitel bereits diskutiert (5.2.3), kann die Ursache der unterschiedlichen Bindung zu den Negativantigenen des Klons B4 in den beiden AK-Formaten in der ungleichen Kultivierungsdauer der NALM-6 Zellen begründet sein. Betrachtet man darüber hinaus die Eigenschaften des Klones B4, der in allen Analysen die schwächsten Bindeaktivitäten zu AML-assoziierten Antigenen zeigte, scheint sich die detektierte Kreuzreaktivität ins Gesamtbild der ermittelten Daten des Klons B4 einzufügen.

Die Kreuzreaktivität der selektionierten Klone wurde ebenfalls auf FFPE-Gewebe analysiert. Im direkten Vergleich zu AML-Beckenkammtrepanaten wurden infiltrat- und malignomfreie Knochenmarkstanzen, sowie Biopsate der Ausscheidungsorgane Niere und Lunge ausgewählt. Da eine Elimination diagnostisch oder therapeutisch applizierter AK über die Niere erfolgt (Colcher et al., 1999), war dieses Resultat von besonderem Interesse. Bei Nieren- und Lungengewebe konnten keine Oberflächenmarkierungen und somit auch keine kreuzreaktive Bindung durch die drei Klone histologisch nachgewiesen werden. Eine minimale Braunfärbung der Schnitte wurde als unspezifische Hintergrundfärbung beschrieben. Diese könnte durch mehrere Zelllagen übereinander, sprich zu dicke Schnitte, bedingt sein. Eine zu hohe Konzentration des Primärantikörpers könnte ebenfalls für unspezifische Hintergrundfärbungen verantwortlich sein (Lang, 2013). Diese bekannte Fehlerquelle sollte durch Anpassung der AK-Konzentrationen, die in Vorversuchen (Daten nicht gezeigt) titriert wurde,

reduziert werden. Die in sehr vielen Geweben aktive Gewebeperoxidase, die durch Umsetzung des Farbstoffs eine „falsch-positive“ Reaktion in Form von Hintergrundrauschen hervorrufen kann, sollte durch vorheriges Abblocken gehemmt werden.

Eine leichte Kreuzreaktivität konnte auf morphologisch gesundem Knochenmark sowohl in der IHC, als auch in der IF durch den Klon H5 beobachtet werden. Klammert man die zuvor genannten Faktoren aus, die eine unspezifische Färbung bedingen können, ist es in Anlehnung an die aufgestellte Theorie in 5.2.3 potentiell denkbar, dass der starke Binder H5 an CD34-positive Zellen gebunden haben könnte. CD34 ist nicht nur ein Blastenmarker bei AML-Patienten, sondern auch generell auf hämatopoetischen Progenitorstammzellen, die auch in einem gesunden Knochenmark in geringer Anzahl vorliegen, exprimiert (Kröger und Zander, 2004).

Abschließend bleibt festzuhalten, dass alle drei intensiv charakterisierten Klone über alle Analysen hinweg keine bis allenfalls schwache Kreuzreaktivität aufweisen. Als am wenigsten spezifisch für ein AML-assoziiertes Antigen, kann der schwach-affine Klon B4 eingestuft werden. Der moderate Binder G2 und der starke H5 zeigten spezifische Färberesultate in den durchgeführten Analysen, sodass diese begründet als spezifische Binder eines AML-assoziierten Antigens deklariert werden können.

### 5.3 Ausblick

Dass eine Generierung von spezifischen Antikörpern mit Hilfe der On-Slide Selektion in Kombination mit der Phage-Display-Technologie möglich ist, konnte bereits von Haaf *et al.* und Fries gezeigt werden, die jeweils spezifische AK gegen SCLC selektionierten (Haaf *et al.*, 2015; Fries, 2017). Resultate der vorliegenden Arbeit, in der es gelungen ist, AML-relevante Binder zu isolieren, demonstrieren eine Entitäten-übergreifende Gültigkeit der Methode.

Es stellt sich gegenwärtig die Frage, welches Ziel diese Methode im Rahmen einer AML-Therapie generell verfolgen sollte. Zum einen kann die Produktion von spezifischen AK für ein Isotypen-spezifisches Epitop eines individuellen AML-Patienten für diagnostische und therapeutische Zwecke angestrebt werden, zum anderen könnte diese Methode weiterhin etabliert werden, um noch unbekannte Leukämie-assoziierte Antigene zu identifizieren. Aktuell existiert kein zugelassener monoklonaler AK im Rahmen der AML-Therapie in Deutschland. Gemtuzumab-Ozogamicin wurde zwar im September 2017 durch die FDA („Food and Drug Administration“) auf dem US-amerikanischen Markt erneut zugelassen, doch gilt in Europa weiterhin die Ablehnung des AK durch die europäische Arzneimittelbehörde EMA aus dem Jahr 2008 (FDA approves Mylotarg for treatment of acute myeloid leukemia [news release]; <https://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm574507.htm>).

Diesem Fakt gegenüber steht die Tatsache, dass es sich bei der AML um eine Erkrankung mit rapidem Krankheitsverlauf handelt, sodass die Produktionsdauer länger als das Überleben eines Patienten sein könnte. Zwar könnte durch einige Optimierungen in der Methode der On-Slide Selektion inklusive der anschließenden Charakterisierungsschritte die Herstellungsdauer verkürzt werden, doch würde sich die Herstellung bis zu einer sicheren klinischen Applikation eines individuell generierten AK als Therapeutikum letztendlich auf mehrere Wochen bis hin zu Monaten belaufen.

Einem potentiell diagnostischen und therapeutischen Einsatz geht die Epitop-identifizierung voraus. Das Wissen gegen welches Targetantigen der generierte AK gerichtet ist und ob dieses tatsächlich Krankheits-spezifisch ist, ist für eine tatsächliche klinische Anwendung zur Verhinderung von Nebenwirkungen oder Fehldiagnosen essentiell. Die aufgestellte These, dass es sich bei dem Zielantigen von H5 um CD34 handeln könnte, ist lediglich eine auf Hinweisen basierende Vermutung, die erst

nachgewiesen werden muss. Ebenfalls ist nicht bekannt, ob die drei charakterisierten Klone das identische Epitop als deren Zielantigen aufweisen. Bei Verfahren, die zur Antigenidentifikation einsetzbar wären, handelt es sich beispielsweise um Massenspektroskopie, 2D-Gelelektrophorese oder komparative genomische Hybridisierung (Carter et al., 2004). Die Identifikation eines unbekanntes Antigens ist oftmals denkbar schwierig. Sanchez-Martin *et al.* analysierten 52 publizierte Studien, in denen AK gegen Tumorgewebe selektioniert wurden (Sanchez-Martin et al., 2015). In nur 55 % der Fälle gelang im Anschluss eine Identifizierung des Antigens. Oftmals handelte es sich dabei dann um stark exprimierte Oberflächenepitope, die bereits zuvor einschlägig als Tumormarker/Wachstumsfaktoren beschrieben waren, wie beispielsweise EGFR oder HER2 (Rust et al., 2013; Kurosawa et al., 2008). Auch Haaf *et al.*, die erstmals zuvor eine On-Slide Selektion durchführten, gelang die Targetidentifizierung im Anschluss an die erfolgreiche Selektion nicht (Haaf et al., 2015). Könnte die Identifizierung gelingen, würde sich eine Charakterisierung des Antigens anschließen. Gasiorowski *et al.* beschrieben Kriterien eines idealen AML-Antigens, das als Target eines diagnostischen oder therapeutischen Einsatzes fungieren kann: Onkogenitätsrisiko, Spezifität, Expressionsstärke auf Blasten sowie Stammzellen und Anzahl der Patienten mit Nachweis dieses Antigens (Gasiorowski et al., 2014; Cheever et al., 2009).

Ein potentiell diagnostischer Einsatz der drei charakterisierten Klone vor allem des starken Binders H5 konnte in FACS-Analysen, Immunhistochemie und Immunfluoreszenz-Analysen in vorangegangenen Kapiteln aufgezeigt werden. Neben der Einsetzbarkeit in der klinischen Diagnosestellung, ist die Nutzung eines monoklonalen AK entweder als (additive) Komponente in der Erstlinientherapie oder als Alternative bei Rezidiven maligner Erkrankungen etabliert. Die therapeutische Wirkung monoklonaler AK basiert auf antikörperabhängiger zellvermittelter Zytotoxizität (ADCC), einer Aktivierung des körpereigenen Komplementsystems oder der Inhibition der Signaltransduktion in die Zelle durch Ligand-Rezeptor-Kommunikation (Krauss, 2003). Die optionale Kopplung mit Immunkonjugaten, z.B. Toxine, kann die therapeutische Wirkung mitunter noch verstärken (vgl. Gemtuzumab-Ozogamicin) (Goldenberg, 1993). Der monoklonale AK (oder dessen Fragment) fungiert in diesem Falle als Transportmolekül und Ligand zur Bindung an Oberflächenmoleküle maligne entarteter Zellen, sodass durch gezielten Transport des Toxins systemische

Nebenwirkungen minimiert werden (Order et al., 1990). Häufig genutzte Toxine sind Substanzen pflanzlichen, wie Rizin und Saporin, oder bakteriellen Ursprungs, wie Diphtherietoxin (*Corynebacterium diphtheriae*), Exotoxin A (*Pseudomonas aeruginosa*) (Dosio et al., 2013) und Calicheamicin (*Micromonospora echinospora*) (Ricart, 2001). Nach Internalisierung und Zerlegung des Immuntoxins im Lysosom der Zielzelle, tritt die zytotoxische Wirkung des Immuntoxins ein. Die zytotoxischen Eigenschaften können beispielsweise auf Deaktivierung der Ribosomen im Rahmen der Proteinbiosynthese oder der Zerstörung der Zellmembran basieren, sodass letztendlich eine Apoptose der Zielzelle ausgelöst wird (Mathew und Verma, 2009). Die beiden funktionalen Einheiten des Immuntoxins (monoklonaler AK und Toxin) können sowohl chemisch, als auch molekulargenetisch/rekombinant miteinander verbunden sein. Neuere Immuntoxine werden meist nur noch rekombinant hergestellt, sodass homogenere Immuntoxine, die außerdem leiglich über die AK-Domäne mit der Zielzelle interagieren können, resultieren (Dosio et al., 2013).

Bis dato ist zwar noch kein Immuntoxin mit Zulassung in standardisierten Therapieprotokollen einer malignen Erkrankung beschrieben, dennoch demonstrieren einige (klinische) Studien vielversprechende Ergebnisse. Beispielsweise konnten Gattenlöhner *et al.* zeigen, dass ein monoklonaler AK gegen den Achetylcholin Rezeptor (anti-fAChR Fab-fragment), der auf Rhabdomyosarkomzellen überexprimiert wird, gekoppelt mit Exotoxin A, zum programmierten Zelltod von Rhabdomyosarkomzelllinien *in vitro* führte (Gattenlöhner et al., 2010).

Bevor ein therapeutischer Einsatz der in vorliegender Arbeit generierten AK als Immuntoxin denkbar wäre, müssten sowohl die molekulargenetische Koppelbarkeit mit dem Toxin selbst, als auch das Internalisierungsverhalten der AK in die Zelle zur Freisetzung des zytotoxischen Wirkstoffs überprüft werden. Gängige Methoden zur Detektion einer regelrechten rezeptorvermittelten Endozytose sind beispielsweise durchflusszytometrische Analysen oder die indirekte Immunfluoreszenz (Maier et al., 1991; Garnett, 1986).

Neben dem Prinzip monoklonale AK direkt gegen AML-assoziierte Oberflächenantigene einzusetzen, seien abschließend noch weitere immuntherapeutische Konzepte vorgestellt, die neben monoklonalen AK mit direkter Wirkung an Tumorzellen, zukünftig in der Therapie der AML eingesetzt werden könnten.

Aktuell wird die Immun-Checkpoint-Inhibition zur Behandlung der AML diskutiert. Als Immun-Checkpoints (IC) bezeichnet man Rezeptoren auf der Oberfläche von T-Lymphozyten, die deren Immunantwort zu stimulieren oder zu supprimieren vermögen. Viele Tumore produzieren im Rahmen der Immunevasion zu diesen Rezeptoren passende Liganden, die somit die T-Zellen supprimieren können, sodass eine Toleranz des Immunsystems gegenüber dem Tumor resultiert (Garrett, 2011). IC-Inhibitoren sollen dieser Toleranz entgegenwirken, um so das eigene Immunsystem wieder für den Tumor zu sensibilisieren. Ein solcher IC-Inhibitor ist beispielsweise Ipilimumab (Anti-CTLA-4), der bereits in der Therapie anderer Malignitäten zugelassen ist. Exemplarisch sei hier das Maligne Melanom genannt (Hodi et al., 2010). Es konnte gezeigt werden, dass im Rahmen der AML der PD-1 (ein IC wie CTLA-4) Signalweg hochreguliert ist, sodass dies einen passenden Angriffspunkt für eine weitere Therapieoption darstellt (Sehgal et al., 2015). Eine noch bessere Wirksamkeit der PD-1-Inhibitoren zeigte sich in der Kombination mit anderen immuntherapeutischen Ansätzen, z.B. mit Vakzinierung von dendritischen Zellen (1.1.4)

Ebenfalls gilt die CAR-T-Zell-Therapie („chimeric antigen receptor“, chimärer Antigenrezeptor) im Rahmen der adoptiven Immuntherapie seit einiger Zeit als vielversprechender Therapieansatz (Fan et al., 2017). Hierbei werden T-Zellen aus dem Blut des Patienten gewonnen, die anschließend gentechnisch so modifiziert werden, dass diese Antigenrezeptoren (CAR) auf ihrer Zelloberfläche ausbilden, die gegen ein Tumor-spezifisches Epitop gerichtet sind. Nach Reinfundierung und Vermehrung *in vivo* sollen diese gezielt die Tumorzellen binden und bekämpfen. Der Erfolg der Methode konnte bei einem an ALL erkrankten Kind, das nach Transfusion der CAR-T-Zellen (anti-CD19, CART-19) eine komplette Remission erreichte, bereits demonstriert werden (Grupp et al., 2013). Analog dazu wurden einige Studien mit anti-CD33 und anti-CD123 CAR-T-Zellen bei AML in Mäusen, xenogen transplantiert, durchgeführt, die eine Eradikation der Myeloblasten zur Folge hatten, aber gleichzeitig auch zu einer inakzeptablen Myeloablation führten (Gill, 2016). Die Problematik hierbei stellt die Unspezifität der Rezeptoren auf den T-Zellen dar. Erst ein spezifisches AML-relevantes Epitop, gegen das die CAR-T-Zellen gerichtet sein könnten, erlaubt die klinische Erprobung dieser Form der Immuntherapie. Gerade im Hinblick darauf ist es umso relevanter, weitere potentielle Zielantigene der AML zu identifizieren. Dies könnte unter anderen mit der in vorliegender Arbeit vorgestellten Methode der On-Slide Selektion zukünftig gelingen.



## 6. Zusammenfassung

Die Heilungsrate der akuten myeloischen Leukämie (AML) im Patientenkollektiv der über 60-Jährigen beträgt trotz intensiver Chemotherapie bis dato weniger als 10 %. Alternativen zu herkömmlichen onkologischen Therapiekonzepten, die eine effizientere Therapie sowie höhere Spezifität und eine damit einhergehende geringere Toxizität versprechen, steigen daher in ihrer Relevanz. Besonders die Therapie mit monoklonalen Antikörpern im Rahmen einer onkologischen Immuntherapie, vermag den vorgestellten Anforderungen an eine effektive und zielgerichtete AML-Therapie gerecht zu werden. Die AML wird als polygenetische und polymorphe Erkrankung mit aktuell noch unbekanntem Oberflächenmolekülen charakterisiert, weshalb sie eine aussichtsreiche Basis für die Entwicklung einer antikörperbasierten Immuntherapie bietet.

Das Ziel vorliegender Arbeit ist die Generierung AML-spezifischer Antikörperfragmente mit Hilfe der Phage-Display-Technologie. Diese stellt die aktuell erfolgreichste Methode zur Herstellung rekombinanter Antikörper *in vitro* dar. Durch eine neu in unserer Arbeitsgruppe etablierte Methode, die On-Slide Selektion direkt auf Formalin-fixiertem in Paraffin-eingebettetem Patientenmaterial (Knochenmarkstanzen eines an AML-erkrankten Patienten, n=1), wurde aus den semi-synthetischen, humanen scFv-Antikörperbibliotheken Tomlinson I und J AML-relevante Binder isoliert. Die On-Slide Selektion beinhaltet neben dem Vorteil auf nativen Antigenen direkt in ihrem physiologischen Gewebeverbund zu selektionieren, auch einen geringeren Vorbereitungsaufwand des Ausgangsmaterials im Vergleich zu standardisierten Selektionsverfahren. Als Ausgangsmaterial dienten archivierte Beckenkammpreparate, die zur routinemäßigen Diagnosestellung AML-Patienten entnommen wurden. Es gelang, vier scFv-Antikörper zu isolieren, deren funktionale Bindeaffinität mittels ELISA und durchflusszytometrischen Analysen auf Zellen der AML-Zelllinie Kasumi-1 nachgewiesen werden konnte. In weiteren Charakterisierungsschritten mit drei selektionierten Antikörpern konnte eine Bindeaktivität auf *ex vivo* Materialien (FFPE-Gewebe, AML-Knochenmarksstanzen) in der Immunhistochemie und in der Immunfluoreszenz ebenfalls bestätigt werden. Diese aussichtsreichen Resultate lassen auf einen potentiell diagnostischen und therapeutischen Einsatz der selektionierten Antikörper nach einer erfolgreichen Antigenidentifikation, sowie auf eine generelle Etablierung der On-Slide Selektion zur Generierung spezifischer Antikörper gegen jedes beliebige Antigen hoffen.

## 6.1 Summary

Despite intensive chemotherapy, the cure rate of acute myeloid leukemia (AML) within the patient group of 60-year-olds amounts to less than 10 % up to this date. Alternative methods to conventional oncologic therapy concepts, which promise a more efficient therapy as well as a higher specificity and as a consequence thereof a lower toxicity, thus rise in relevance. In particular, the therapy with monoclonal antibodies in the context of an oncologic immunotherapy assures to meet the requirements of an effective and targeted AML therapy. AML is characterized as a polygenetic and polymorphic disease with to this date yet unknown surface markers, which is why it provides a basis with good prospects for the development of an antibody-based therapy.

This study's aim is the generation of AML specific antibody fragments. This is going to be achieved with the help of the phage display technology, which currently constitutes the most successful and prosperous method for producing recombinant antibodies *in vitro*. Our study group has established a new method, referred to as on-slide selection. This procedure operates through a selection directly on formalin-fixed in paraffin-embedded (FFPE) patient material (n=1). Thereby, AML relevant antibodies were isolated from the semi-synthetic, human scFv antibody libraries Tomlinson I and J. The on-slide selection has not only the advantage of selecting on native antigens directly in their native environment, but also requires only little preparation expenses compared to standardized selection processes. Bone marrow tissues, extracted from AML patients for the purpose of routinely making diagnoses, served as the base material. Four scFv antibodies, whose functional binding affinity could be verified through ELISA and flow cytometry on cells of a human acute myeloid leukemia cell line (Kasumi-1), were isolated. In further steps of characterizing three selected antibodies, a binding activity on *ex vivo* material (FFPE tissue, AML bone marrow tissue) in immunohistochemistry and immunofluorescence could be attested as well. These promising results therefore not only endorse a potential diagnostic and therapeutic application of the selected antibodies, after successful antigen identification, but also fuel hopes of a general establishment of the on-slide selection in order to generate specific antibodies against any arbitrary antigen.

**Abkürzungsverzeichnis**

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ	mikro-
Abb.	Abbildung
ADCC	„antibody-dependent cytotoxicity“ / Antikörperabhängige-Zellzytotoxizität
AK	Antikörper
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
Amp	Ampicillin
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
CAR	„chimeric antigen receptor“, chimärer Antigenrezeptor
CD	„Cluster of Differentiation“ / Differenzierungsmarker an der Zelloberfläche
CDR	„complementarity determining regions“ / komplementaritätsbestimmende Regionen
cfu	„colonie forming unit“ / koloniebildende Einheit
CH	„constant region of heavy chain“ / Konstante Region der schweren Kette
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CR	„complete remission“ / komplette Remission
Da	Dalton
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
ddNTP	Didesoxyribonukleosid-Triphosphat
DGHO	Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie
DNA	„deoxyribonucleic acid“ / Desoxyribonucleinsäure

---

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	„epidermal growth factor receptor“
ELISA	„enzyme-linked immunosorbent assay“
Fab	„Fragment antigen binding“ / antigenbindendes Fragment
FAB	„French-American-British“
FACS	„fluorescence-activated cell sorting“ / Fluoreszenzaktivierter Zellsortierer
FBS	„foetal bovine serum“ / Fetales Kälberserum
Fc	„fragment crystallizable“, kristallisierbares Fragment
FDA	„Food and Drug Administration“
FFPE	Formalin-fixiertes, Paraffin-eingebettetes Gewebe
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FR	„framework regions“ / Gerüstregionen
g	Gramm
gam	„goat anti-mouse“ / Ziege anti-Maus
Gluc	Glucose
GRN-HLog	„green fluorescence intensity“ / grüne Fluoreszenzintensität
GYPC	Glycophorin C
h	Stunde
HEK-Zellen	„Human Embryonic Kidney“-Zellen / menschliche embryonale Nierenzellen
HER2	„human epidermal growth factor receptor 2“
HIER	„heat-induced epitop retrieval“
HLA-DR	„human leukocyte antigen – antigen D Related“ / Humanes Leukozytenantigen
HRP	„horseradish peroxidase“ / Meerrettichperoxidase
IC	Immun-Checkpoint
IF	Immunfluoreszenz
IgA	Immunglobulin A
IgD	Immunglobulin D
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G

---

IgM	Immunglobulin M
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
inv	Chromosomeninversion
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LAA	Leukämie-assoziiertes Antigen
LCM	„laser capture microdissection“
M	Molar
mA	Miliampere
MDS	Myelodisplastisches Syndrom
MF	Membranfragmente
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOI	„multiplicity of infection“ / Multiplizität der Infektion
MPBS	Milchpuver in phosphatgepufferter Salzlösung
MRD	„minimal rest disease“ / Minimale Resterkrankung
mRNA	„messenger ribonucleic acid“
NaCl	Natriumchlorid
NEB	„New England Biolabs“
ng	Nanogramm
Ni <sup>2+</sup>	Nickel(2+)
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBMC	„peripheral blood mononuclear cell“ / mononukleäre Zellen des peripheren Bluts

---

PBS	„phosphate buffered saline“ / phosphatgepufferte Salzlösung
PBST	„phosphate buffered saline“ mit 0,1 % Tween 20
PCR	„polymerase chain reaction“ / Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglycol
PFA	Paraformaldehyd
pH	„potentia hydrogenii“ / Stärke des Wasserstoffs
PIER	„proteolytic induced epitop retrieval“
pIII	Phagenhüllprotein III
RBS	Ribosomale Bindungsstelle
rpm	„revolutions per minute“ / Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SA-PE	Streptavidin, R-Phycoerythrin Konjugat
scFv	„single chain variable fragment“ / Einzelkettenantikörper
SCLC	„small cell lung cancer“ / Kleinzelliges Bronchialkarzinom
SOC	„Super Optimal broth with Catabolite repression“-Medium
SZT	Stammzelltransplantation
t	Chromosomentranslokation
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	Thermus aquaticus
TBS	„Tris buffered saline“ / Tris-gepufferte Salzlösung
TBST	„Tris buffered saline“ mit 0,1 % Tween 20
TEA	Triethylamin
TMA	Tissue Microarray
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
UKGM	Universitätsklinikum Gießen und Marburg
ÜN-Kultur	Übernachtskultur
UV	Ultraviolett (-Strahlung)
V	Volt
V <sub>H</sub>	„variable heavy chain“ / variable schwere Kette

---

V <sub>L</sub>	„variable light chain“ / variable leichte Kette
W	Watt
WHO	World Health Organization

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung eines IgG-Antikörpers und seiner funktionellen Fragmente.....	11
Abbildung 2: Schematische Darstellung des pIT2-Vektors (Phagemid) der Tomlinson Bibliotheken .....	16
Abbildung 3: Schematische Darstellung eines M13-Bakteriophagen aus der Klasse der Ff-Phagen .....	17
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Ablaufs der „panning“-Runden zur Selektion spezifischer Antikörper.....	20
Abbildung 5: Balkendiagramm des Quotienten aus Output- zu Input-Titer der einzelnen Selektionsrunden im Vergleich .....	60
Abbildung 6: Bild einer ELISA-Mikrotiterplatte des Resultats des polyklonalen ELISAs .....	62
Abbildung 7: Balkendiagramm der Absorptionsstärke in nm der getesteten scFv-präsentierende Phagen der unterschiedlichen Runden im Vergleich zur original Tomlinson J Bibliothek.....	62
Abbildung 8: Bild einer ELISA-Mikrotiterplatte des Resultats des ersten monoklonalen ELISAs, 88 Klone getestet auf MF Kasumi (A) und auf BSA (B) .....	63
Abbildung 9: Balkendiagramm der Absorptionsstärke in nm der positiv getesteten Klone im zweiten monoklonalen ELISA .....	64
Abbildung 10: Histogramm-Darstellung der Transfektionseffizienz der HEK-293T Zellen mittels Durchflusszytometrie.....	66
Abbildung 11: Nachweis der Herstellung der scFv-Fc Fusionsproteine im Western Blot (A) und in der Ponceau-Färbung (B) .....	67
Abbildung 12: Histogramm-Darstellung des Bindungsverhaltens der scFv-Fc Fusionsproteine auf Zelllinien mittels Durchflusszytometrie .....	68
Abbildung 13: Bindungsverhalten der löslichen scFv-Fc Fusionsproteine auf Zelllinien mittels Durchflusszytometrie .....	69
Abbildung 14: Histogramm-Darstellung des Bindungsverhaltens der scFv-Fc Fusionsproteine auf PBMC's von drei an AML erkrankten Patienten mittels Durchflusszytometrie.....	70
Abbildung 15: Nachweis der Herstellung der Fab-Fragmente im Western Blot.....	71
Abbildung 16: Histogramm-Darstellung des Bindungsverhaltens der Fab-AK-Fragmente auf Zelllinien mittels Durchflusszytometrie .....	72
Abbildung 17: Bindungsverhalten der Fab-Antikörperfragmente auf Zelllinien mittels Durchflusszytometrie.....	73
Abbildung 18: Resultate immunhistochemischer Färbungen der Fab-Antikörperfragmente auf diversen Geweben .....	75
Abbildung 19: Resultate der Immunfluoreszenz-Färbungen des Fab-Antikörperfragments H5 auf Beckenkammpreparaten einer AML M2 (A) und morphologisch gesundem Knochenmark (B) mit Gegenfärbungen relevanter Oberflächenmoleküle.....	78



**Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: FAB-Klassifikation der akuten myeloischen Leukämie mit relativer Häufigkeit (%) der einzelnen Subtypen.....	5
Tabelle 2: WHO-Klassifikation der akuten myeloischen Leukämie und deren Prognose	6
Tabelle 3: Waschprotokolle der jeweiligen Selektionsrunde .....	37
Tabelle 4: Kolonie-PCR - Ansatz und Durchführung .....	42
Tabelle 5: Sequenzierungs-PCR - Ansatz und Durchführung .....	42
Tabelle 6: PCR im Rahmen der ortsgerichteten Mutagenese - Ansatz und Durchführung .....	43
Tabelle 7: PCR im Rahmen der Herstellung von Restriktionsschnittstellen - Ansatz und Durchführung .....	43
Tabelle 8: Ansatz eines Restriktionsverdau .....	46
Tabelle 9: Umklonierungsschritte für die Umwandlung von scFv-Fragmenten in Fab-Fragmente in chronologischem Ablauf.....	49
Tabelle 10: Kultivierungskonditionen und Verwendungszweck der Zelllinien .....	51
Tabelle 11: Input- und Output-Titer der einzelnen Selektionsrunden im Vergleich sowie die daraus resultierenden Anreicherungs-faktoren .....	61
Tabelle 12: Einteilung der positiv getesteten Klone im ersten monoklonalen ELISA nach Absorptionstärke .....	64
Tabelle 13: Aminosäuresequenz der leichten und schweren Ketten der selektierten Klone nach ortsgerichteter Mutagenese.....	65
Tabelle 14: Tabellarische Gegenüberstellung der Bindungsaktivität der identifizierten Klone in verschiedenen AK-Formaten auf Positivantigenen.....	95

**Literaturverzeichnis**

- Abramson, Neil; Melton, Becky (2000): Leukocytosis: basics of clinical assessment. In: *American family physician* (62.9), S. 2053–2066.
- Ackermann, Hans-W.; Audurier, André; Berthiaume, Laurent; Jones, Lily A.; Mayo, John A.; Vidaver, Anne K. (Hg.) (1978): *Advances in Virus Research Volume 23. Guidelines for Bacteriophage Characterization*. 23. Auflage, Elsevier (Advances in Virus Research).
- Arap, Wadih; Kolonin, Mikhail G.; Trepel, Martin; Lahdenranta, Johanna; Cardó-Vila, Marina; Giordano, Ricardo J. et al. (2002): Steps toward mapping the human vasculature by phage display. In: *Nature medicine* 8 (2), S. 121–127.
- Arber, Daniel A.; Orazi, Attilio; Hasserjian, Robert; Thiele, Jürgen; Borowitz, Michael J.; Le Beau, Michelle M. et al. (2016): The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. In: *Blood* 127 (20), S. 2391–2405.
- Arevalo, J. H.; Taussig, M. J.; Wilson, I. A. (1993): Molecular basis of crossreactivity and the limits of antibody-antigen complementarity. In: *Nature* 365 (6449), S. 859–863.
- Asou, H.; Tashiro, S.; Hamamoto, K.; Otsuji, A.; Kita, K.; Kamada, N. (1991): Establishment of a human acute myeloid leukemia cell line (Kasumi-1) with 8;21 chromosome translocation. In: *Blood* 77 (9), S. 2031–2036.
- Barbas, C. F.; Burton, D. R.; Scott, J.K.; Silverman, G. J. (2004): *Phage Display. A Laboratory Manual*. 1.Auflage, 1.Oktober 2004. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Barderas, Rodrigo; Shochat, Susana; Martínez-Torrecedrada, Jorge; Altschuh, Danièle; Meloen, Rob; Ignacio Casal, Jose (2006): A fast mutagenesis procedure to recover soluble and functional scFvs containing amber stop codons from synthetic and semisynthetic antibody libraries. In: *Journal of Immunological Methods* 312 (1-2), S. 182–189.
- Barrett, A. J.; Le Blanc, K. (2010): Immunotherapy prospects for acute myeloid leukaemia. In: *Clinical and experimental immunology* 161 (2), S. 223–232.
- Bataille, Frauke; Troppmann, Sabine; Klebl, Frank; Rogler, Gerhard; Stoelcker, Benjamin; Hofstadter, Ferdinand et al. (2006): Multiparameter immunofluorescence on paraffin-embedded tissue sections. In: *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM* 14 (2), S. 225–228.
- Bennett, J. M.; Catovsky, D.; Daniel, Marie-Therese; Flandrin, G.; Galton, D. A. G.; Gralnick, H. R.; Sultan, C. (1976): Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias French-American-British (FAB) Co-operative Group. In: *Br J Haematol* 33 (4), S. 451–458.
- Bhatnagar, Bakul S.; Bogner, Robin H.; Pikal, Michael J. (2007): Protein stability during freezing. Separation of stresses and mechanisms of protein stabilization. In: *Pharmaceutical development and technology* 12 (5), S. 505–523.
- Birnboim, H. C.; Doly, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. In: *Nucleic acids research* 7 (6), S. 1513–1523.

- Bradbury, Andrew R. M.; Sidhu, Sachdev; Dübel, Stefan; McCafferty, John (2011): Beyond natural antibodies. The power of in vitro display technologies. In: *Nature biotechnology* 29 (3), S. 245–254.
- Burnett, Alan K.; Milligan, Donald; Prentice, Archie G.; Goldstone, Anthony H.; McMullin, Mary F.; Hills, Robert K.; Wheatley, Keith (2007): A comparison of low-dose cytarabine and hydroxyurea with or without all-trans retinoic acid for acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome in patients not considered fit for intensive treatment. In: *Cancer* 109 (6), S. 1114–1124.
- Burton, D. R.; Barbas, C. F.; Persson, M. A.; Koenig, S.; Chanock, R. M.; Lerner, R. A. (1991): A large array of human monoclonal antibodies to type 1 human immunodeficiency virus from combinatorial libraries of asymptomatic seropositive individuals. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (22), S. 10134–10137.
- Campana, D.; Pui, C. H. (1995): Detection of minimal residual disease in acute leukemia. Methodologic advances and clinical significance. In: *Blood* 85 (6), S. 1416–1434.
- Carter, Paul; Smith, Leia; Ryan, Maureen (2004): Identification and validation of cell surface antigens for antibody targeting in oncology. In: *Endocrine-related cancer* 11 (4), S. 659–687.
- Cheever, Martin A.; Allison, James P.; Ferris, Andrea S.; Finn, Olivera J.; Hastings, Benjamin M.; Hecht, Toby T. et al. (2009): The prioritization of cancer antigens. A national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 15 (17), S. 5323–5337.
- Christ, Daniel; Lee, Carol M. Y.; Iorno, Niccolo; Sierro, Frederic (2007): Selection of human antibody fragments by phage display. In: *Nature protocols* 2 (11), S. 3001–3008.
- Clackson, T.; Hoogenboom, H. R.; Griffiths, A. D.; Winter, G. (1991): Making antibody fragments using phage display libraries. In: *Nature* 352 (6336), S. 624–628.
- Colcher, D.; Goel, A.; Pavlinkova, G.; Beresford, G.; Booth, B.; Batra, S. K. (1999): Effects of genetic engineering on the pharmacokinetics of antibodies. In: *The quarterly journal of nuclear medicine : official publication of the Italian Association of Nuclear Medicine (AIMN) [and] the International Association of Radiopharmacology (IAR)* 43 (2), S. 132–139.
- Davies, D. R.; Padlan, E. A.; Sheriff, S. (1990): Antibody-antigen complexes. In: *Annual review of biochemistry* 59, S. 439–473.
- Davis, A. Sally; Richter, Anke; Becker, Steven; Moyer, Jenna E.; Sandouk, Aline; Skinner, Jeff; Taubenberger, Jeffery K. (2014): Characterizing and Diminishing Autofluorescence in Formalin-fixed Paraffin-embedded Human Respiratory Tissue. In: *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 62 (6), S. 405–423.
- Deng, L. W.; Malik, P.; Perham, R. N. (1999): Interaction of the globular domains of pIII protein of filamentous bacteriophage fd with the F-pilus of Escherichia coli. In: *Virology* 253 (2), S. 271–277.

- Derda, Ratmir; Tang, Sindy K. Y.; Li, S. Cory; Ng, Simon; Matochko, Wadim; Jafari, Mohammad R. (2011): Diversity of phage-displayed libraries of peptides during panning and amplification. In: *Molecules (Basel, Switzerland)* 16 (2), S. 1776–1803.
- Deschler, Barbara; Lübbert, Michael (2006): Acute myeloid leukemia. Epidemiology and etiology. In: *Cancer* 107 (9), S. 2099–2107.
- Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO): Leitlinien der DGHO für Diagnostik und Therapie der Akuten Myeloischen Leukämie (AML). [www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/akute-myeloische-leukaemie-aml](http://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/akute-myeloische-leukaemie-aml)
- Döhner, Hartmut; Estey, Elihu H.; Amadori, Sergio; Appelbaum, Frederick R.; Büchner, Thomas; Burnett, Alan K. et al. (2010): Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults. Recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. In: *Blood* 115 (3), S. 453–474.
- Donaldson, Julie G. (2015): Immunofluorescence Staining. In: *Current protocols in cell biology* 69, 4.3.1-7.
- Dosio, Franco; Stella, Barbara; Cerioni, Sofia; Gastaldi, Daniela; Arpicco, Silvia (2013): Advances in Anticancer Antibody-Drug Conjugates and Immunotoxins. In: *PRA* 9 (1), S. 35–65.
- Duncan, Caroline; Roddie, Huw (2008): Dendritic cell vaccines in acute leukaemia. In: *Best practice & research. Clinical haematology* 21 (3), S. 521–541.
- el-Shami, K.; Smith, B. D. (2008): Immunotherapy for myeloid leukemias. Current status and future directions. In: *Leukemia* 22 (9), S. 1658–1664.
- European Medicines Agency (2008): Questions and Answers on Recommendation for the Refusal of the Marketing Authorisation for Mylotarg - Gemtuzumab ozogamicin, zuletzt geprüft am 13.09.2017.
- Fan, Mingxue; Li, Minghao; Gao, Lipeng; Geng, Sicong; Wang, Jing; Wang, Yiting et al. (2017): Chimeric antigen receptors for adoptive T cell therapy in acute myeloid leukemia. In: *Journal of hematology & oncology* 10 (1), S. 151.
- Fenaux, Pierre; Mufti, Ghulam J.; Hellström-Lindberg, Eva; Santini, Valeria; Gattermann, Norbert; Germing, Ulrich et al. (2010): Azacitidine prolongs overall survival compared with conventional care regimens in elderly patients with low bone marrow blast count acute myeloid leukemia. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 28 (4), S. 562–569.
- Fischer, Thomas; Stone, Richard M.; Deangelo, Daniel J.; Galinsky, Ilene; Estey, Elihu; Lanza, Carlo et al. (2010): Phase IIB trial of oral Midostaurin (PKC412), the FMS-like tyrosine kinase 3 receptor (FLT3) and multi-targeted kinase inhibitor, in patients with acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome with either wild-type or mutated FLT3. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 28 (28), S. 4339–4345.
- Fitting, Jenny (2012): Generierung, Charakterisierung und Funktionalisierung rekombinanter Antikörperfragmente gegen leukämische und dendritische Zellen. Entwicklung diagnostischer und immuntherapeutischer Werkzeuge mit Hilfe der "Phage Display"-Technologie. Aachen, Techn. Hochsch., Diss., 2012. Online verfügbar unter <http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=urn:nbn:de:hbz:82-opus-43079>.

- Fong, C. T.; Brodeur, G. M. (1987): Down's syndrome and leukemia. Epidemiology, genetics, cytogenetics and mechanisms of leukemogenesis. In: *Cancer genetics and cytogenetics* 28 (1), S. 55–76.
- Fries, Katharina (2017): Etablierung des Einsatzes von formalin-fixiertem paraffin-eingebettetem Gewebe (FFPE-Gewebe) zur Antikörper-Selektion mittels der Phage-Display-Methode am Beispiel des kleinzelligen Bronchialkarzinoms (SCLC). Universitätsbibliothek; VVB LAUFERSWEILER Verlag, Gießen. Online verfügbar unter <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2017/13124>.
- Garnett, M. C.; Baldwin, R. W. (1986): Endocytosis of a monoclonal antibody recognising a cell surface glycoprotein antigen visualised using fluorescent conjugates. In: *European journal of cell biology* 41 (2), S. 214–221.
- Garrett, Michelle D.; Collins, Ian (2011): Anticancer therapy with checkpoint inhibitors. What, where and when? In: *Trends in pharmacological sciences* 32 (5), S. 308–316.
- Gasiorowski, Robin E.; Clark, Georgina J.; Bradstock, Kenneth; Hart, Derek N. J. (2014): Antibody therapy for acute myeloid leukaemia. In: *Br J Haematol* 164 (4), S. 481–495.
- Gattenlöhner, S.; Jörissen, H.; Huhn, M.; Vincent, A.; Beeson, D.; Tzartos, S. et al. (2010): A human recombinant autoantibody-based immunotoxin specific for the fetal acetylcholine receptor inhibits rhabdomyosarcoma growth in vitro and in a murine transplantation model. In: *Journal of biomedicine & biotechnology* 2010, S. 187621.
- Gill, Saar (2016): Chimeric antigen receptor T cell therapy in AML. How close are we? In: *Best practice & research. Clinical haematology* 29 (4), S. 329–333.
- Goldenberg, David M. (1993): Monoclonal antibodies in cancer detection and therapy. In: *The American Journal of Medicine* 94 (3), S. 297–312.
- Griffiths, A. D.; Malmqvist, M.; Marks, J. D.; Bye, J. M.; Embleton, M. J.; McCafferty, J. et al. (1993): Human anti-self antibodies with high specificity from phage display libraries. In: *The EMBO journal* 12 (2), S. 725–734.
- Grillo-López, A. J.; White, C. A.; Dallaire, B. K.; Varns, C. L.; Shen, C. D.; Wei, A. et al. (2000): Rituximab. The first monoclonal antibody approved for the treatment of lymphoma. In: *Current pharmaceutical biotechnology* 1 (1), S. 1–9.
- Grupp, Stephan A.; Kalos, Michael; Barrett, David; Aplenc, Richard; Porter, David L.; Rheingold, Susan R. et al. (2013): Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. In: *The New England journal of medicine* 368 (16), S. 1509–1518.
- Gur, Deniz; Liu, Suling; Shukla, Anurag; Pero, Stephanie C.; Wicha, Max S.; Krag, David N. (2009): Identification of single chain antibodies to breast cancer stem cells using phage display. In: *Biotechnology progress* 25 (6), S. 1780–1787.
- Haaf, Andre ten; Pscherer, Sibylle; Fries, Katharina; Barth, Stefan; Gattenlöhner, Stefan; Tur, Mehmet Kemal (2015): Phage display-based on-slide selection of tumor-specific antibodies on formalin-fixed paraffin-embedded human tissue biopsies. In: *Immunology letters* 166 (2), S. 65–78.
- Hawkins, Robert E.; Russell, Stephen J.; Winter, Greg (1992): Selection of phage antibodies by binding affinity. In: *Journal of molecular biology* 226 (3), S. 889–896.

- Herold, Gerd (2014): Innere Medizin. Eine vorlesungsorientierte Darstellung. 1.Auflage, 1. Oktober 2013. Köln: Herold.
- Hiddemann, W.; Bartram, C. R. (2010): Die Onkologie. Akute myeloische Leukämie. 2., aktualisierte Aufl. Berlin: Springer.
- Hochhaus, A., Druker, B. J., Larson, R. A., O'Brien, S. G., Gathmann, I., & Guilhot, F. (2007). IRIS 6-year follow-up: sustained survival and declining annual rate of transformation in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase (CML-CP) treated with imatinib. In: *Blood Journals* 110 (11), S. 1-25
- Hodi, F. Stephen; O'Day, Steven J.; McDermott, David F.; Weber, Robert W.; Sosman, Jeffrey A.; Haanen, John B. et al. (2010): Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. In: *The New England journal of medicine* 363 (8), S. 711–723.
- Hoogenboom, H. R.; Winter, G. (1992): By-passing immunisation. Human antibodies from synthetic repertoires of germline VH gene segments rearranged in vitro. In: *Journal of molecular biology* 227 (2), S. 381–388.
- Hu, Francis Jingxin; Volk, Anna-Luisa; Persson, Helena; Säll, Anna; Borrebaeck, Carl; Uhlen, Mathias; Rockberg, Johan (2017): Combination of phage and Gram-positive bacterial display of human antibody repertoires enables isolation of functional high affinity binders. In: *New Biotechnology*.
- Hudson, P. J. (2000): Recombinant antibodies. A novel approach to cancer diagnosis and therapy. In: *Expert opinion on investigational drugs* 9 (6), S. 1231–1242.
- Ikeda, K.; Monden, T.; Kanoh, T.; Tsujie, M.; Izawa, H.; Haba, A. et al. (1998): Extraction and analysis of diagnostically useful proteins from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. In: *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 46 (3), S. 397–403.
- Jakobsen, Charlotte G.; Rasmussen, Nicolaj; Laenkholm, Anne-Vibeke; Ditzel, Henrik J. (2007): Phage display derived human monoclonal antibodies isolated by binding to the surface of live primary breast cancer cells recognize GRP78. In: *Cancer research* 67 (19), S. 9507–9517.
- Janeway, Charles A.; Murphy, Kenneth; Travers, Paul; Walport, Mark; Seidler, Lothar; Hausser-Siller, Ingrid (2009): Janeway Immunologie. 7. Auflage, 17. September 2009. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Jarutat, Tiantom; Nickels, Cora; Frisch, Christian; Stellmacher, Florian; Hofig, Kai Peter; Knappik, Achim; Merz, Hartmut (2007): Selection of vimentin-specific antibodies from the HuCAL phage display library by subtractive panning on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. In: *Biological chemistry* 388 (6), S. 651–658.
- Kallioniemi, O.-P.; Wagner, Urs; Kononen, Juha; Sauter, Guido (2001): Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. In: *Human Molecular Genetics* 10 (7), S. 657–662.
- Kay, Brian K.; Winter, Jill (2008): Phage display of peptides and proteins. A laboratory manual. San Diego [etc.]: Academic Press.
- Khalidi, Hasan S.; Medeiros, L. Jeffrey; Chang, Karen L.; Brynes, Russell K.; Slovak, Marilyn L.; Arber, Daniel A. (1998): The Immunophenotype of Adult Acute Myeloid Leukemia. High Frequency of Lymphoid Antigen Expression and

- Comparison of Immunophenotype, French-American-British Classification, and Karyotypic Abnormalities. In: *Am J Clin Pathol* 109 (2), S. 211–220.
- Klimka, A.; Barth, S.; Matthey, B.; Roovers, R. C.; Lemke, H.; Hansen, H. et al. (1999): 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. In: *British journal of cancer* 80 (8), S. 1214–1222.
- Köhler, G.; Milstein, C. (2005): Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. 1975. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 174 (5), S. 2453–2455.
- Kouchkovsky, I. de; Abdul-Hay, M. (2016): Acute myeloid leukemia. A comprehensive review and 2016 update. In: *Blood cancer journal* 6 (7), e441.
- Kramer, K. (2002): A generic strategy for subcloning antibody variable regions from the scFv phage display vector pCANTAB 5 E into pASK85 permits the economical production of Fab fragments and leads to improved recombinant immunoglobulin stability. In: *Biosensors and Bioelectronics* 17 (4), S. 305–313.
- Krauss, Jürgen (2003): Recombinant antibodies for the diagnosis and treatment of cancer. In: *Molecular biotechnology* 25 (1), S. 1–17.
- Kröger, Nicolaus; Zander, Axel R. (2004): *Allogene Stammzelltherapie - Grundlagen, Indikationen und Perspektiven*. 1. Aufl. Bremen: Uni-Med (UNI-MED Science).
- Krug, Utz; Büchner, Thomas; Berdel, Wolfgang E.; Müller-Tidow, Carsten (2011): The treatment of elderly patients with acute myeloid leukemia. In: *Deutsches Arzteblatt international* 108 (51-52), S. 863–870.
- Kügler, Jonas; Zantow, Jonas; Meyer, Torsten; Hust, Michael (2013): Oligopeptide m13 phage display in pathogen research. In: *Viruses* 5 (10), S. 2531–2545.
- Kumar, Vinay; Fausto, Nelson; Abbas, Abdul K.; Mitchell, Richard N. (2008): *Robbins basic pathology*. 1. Auflage, 31. Mai 2007. Philadelphia, Pa: W.B. Saunders.
- Kurosaki, Yohei; Abe, Hideki; Morioka, Hiroshi; Hirayama, Junichi; Ikebuchi, Kenji; Kamo, Naoki et al. (2003): Pyrimidine dimer formation and oxidative damage in M13 bacteriophage inactivation by ultraviolet C irradiation. In: *Photochemistry and photobiology* 78 (4), S. 349–354.
- Kurosawa, Gene; Akahori, Yasushi; Morita, Miwa; Sumitomo, Mariko; Sato, Noriko; Muramatsu, Chiho et al. (2008): Comprehensive screening for antigens overexpressed on carcinomas via isolation of human mAbs that may be therapeutic. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (20), S. 7287–7292.
- Lang, Gudrun (2013): *Histotechnik*. 2. Auflage, 4. Oktober 2012. Vienna: Springer Vienna.
- Larizza, Lidia; Magnani, Ivana; Beghini, Alessandro (2005): The Kasumi-1 cell line. A t(8;21)-kit mutant model for acute myeloid leukemia. In: *Leukemia & lymphoma* 46 (2), S. 247–255.
- Larsen, Simon Asbjørn; Meldgaard, Theresa; Lykkemark, Simon; Mandrup, Ole Aalund; Kristensen, Peter (2015): Selection of cell-type specific antibodies on tissue-sections using phage display. In: *Journal of cellular and molecular medicine* 19 (8), S. 1939–1948.

- Liu, Yanli; Adams, Jonathan D.; Turner, Kelisha; Cochran, Frank V.; Gambhir, Sanjiv Sam; Soh, H. Tom (2009): Controlling the selection stringency of phage display using a microfluidic device. In: *Lab on a chip* 9 (8), S. 1033–1036.
- Löwenberg, B.; Downing, J. R.; Burnett, A. (1999): Acute myeloid leukemia. In: *The New England journal of medicine* 341 (14), S. 1051–1062.
- Lu, Hai; Jin, Dadi; Kapila, Yvonne L. (2004): Application of laser capture microdissection to phage display peptide library screening. In: *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* 98 (6), S. 692–697.
- Lu, Jun; Sloan, Steven R. (1999): An alternating selection strategy for cloning phage display antibodies. In: *Journal of Immunological Methods* 228 (1-2), S. 109–119.
- Luttmann, Werner (2014): Der Experimentator. Immunologie. 4. Auflage, 28. April 2014. Berlin: Springer (Der Experimentator).
- Macdonald, D.; Jiang, Y. Z.; Gordon, A. A.; Mahendra, P.; Oskam, R.; Palmer, P. A. et al. (1990): Recombinant interleukin 2 for acute myeloid leukaemia in first complete remission. A pilot study. In: *Leukemia research* 14 (11-12), S. 967–973.
- Maier, L. A.; Xu, F. J.; Hester, S.; Boyer, C. M.; McKenzie, S.; Bruskin, A. M. et al. (1991): Requirements for the internalization of a murine monoclonal antibody directed against the HER-2/neu gene product c-erbB-2. In: *Cancer research* 51 (19), S. 5361–5369.
- Marcus, Warren D.; Lindsay, Stuart M.; Sierks, Michael R. (2006): Identification and repair of positive binding antibodies containing randomly generated amber codons from synthetic phage display libraries. In: *Biotechnology progress* 22 (3), S. 919–922.
- Marks, J. D.; Hoogenboom, H. R.; Bonnert, T. P.; McCafferty, J.; Griffiths, A. D.; Winter, G. (1991): By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. In: *Journal of molecular biology* 222 (3), S. 581–597.
- Marks, J. D.; Ouwehand, W. H.; Bye, J. M.; Finnern, R.; Gorick, B. D.; Voak, D. et al. (1993): Human antibody fragments specific for human blood group antigens from a phage display library. In: *Bio/technology (Nature Publishing Company)* 11 (10), S. 1145–1149.
- Mason, D. Y.; Micklem, K.; Jones, M. (2000): Double immunofluorescence labelling of routinely processed paraffin sections. In: *The Journal of pathology* 191 (4), S. 452–461.
- Mathew, Mrudula; Verma, Rama S. (2009): Humanized immunotoxins. A new generation of immunotoxins for targeted cancer therapy. In: *Cancer science* 100 (8), S. 1359–1365.
- Mayer, Marcus (2003): Expression und Faltung von Antikörpern im Cytoplasma von *E. coli* und Einfluss von Faltungshelfern auf die Antikörperfaltung in vitro. In: *Journal of Molecular Biology* 341(4), S.1077–1084
- Mayrose, Itay; Shlomi, Tomer; Rubinstein, Nimrod D.; Gershoni, Jonathan M.; Ruppin, Eytan; Sharan, Roded; Pupko, Tal (2007): Epitope mapping using combinatorial phage-display libraries. A graph-based algorithm. In: *Nucleic acids research* 35 (1), S. 69–78.



- Metzelder, S. K.; Wollmer, E.; Neubauer, A.; Burchert, A. (2010): Sorafenib bei rezidivierender und therapierefraktärer FLT3-ITD-positiver akuter myeloischer Leukämie. Eine neue Behandlungsoption. In: *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)* 135 (38), S. 1852–1856.
- Miller, Liliya (2016): PhD thesis\_Liliya Miller: Expression Libraries as Tools for the Development of Subunit Vaccines and Novel Detection Molecules for Orthopoxviruses. März 2016.
- Miller, R. T. (2001): Achieving reliability and reproducibility of immunostains. Technical Immunohistochemistry. By: *Society of Applied Immunohistochemistry Meeting* 2001.
- Miroux, B.; Walker, J. E. (1996): Over-production of proteins in Escherichia coli. Mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. In: *Journal of molecular biology* 260 (3), S. 289–298.
- Moriya, M. (1993): Single-stranded shuttle phagemid for mutagenesis studies in mammalian cells. 8-oxoguanine in DNA induces targeted G.C, T.A transversions in simian kidney cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (3), S. 1122–1126.
- Moutel, Sandrine; El Marjou, Ahmed; Vielemeyer, Ole; Nizak, Clément; Benaroch, Philippe; Dübel, Stefan; Perez, Franck (2009): A multi-Fc-species system for recombinant antibody production. In: *BMC biotechnology* 9, S. 14.
- Mrózek, Krzysztof; Heerema, Nyla A.; Bloomfield, Clara D. (2004): Cytogenetics in acute leukemia. In: *Blood Reviews* 18 (2), S. 115–136.
- Nieba, L.; Honegger, A.; Krebber, C.; Plückthun, A. (1997): Disrupting the hydrophobic patches at the antibody variable/constant domain interface. Improved in vivo folding and physical characterization of an engineered scFv fragment. In: *Protein engineering* 10 (4), S. 435–444.
- Nissim, A.; Hoogenboom, H. R.; Tomlinson, I. M.; Flynn, G.; Midgley, C.; Lane, D.; Winter, G. (1994): Antibody fragments from a 'single pot' phage display library as immunochemical reagents. In: *The EMBO journal* 13 (3), S. 692–698.
- Oken, M. M.; Creech, R. H.; Tormey, D. C.; Horton, J.; Davis, T. E.; McFadden, E. T.; Carbone, P. P. (1982): Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. In: *American journal of clinical oncology* 5 (6), S. 649–655.
- Order, S. E.; Sleeper, A. M.; Stillwagon, G. B.; Klein, J. L.; Leichner, P. K. (1990): Radiolabeled antibodies. Results and potential in cancer therapy. In: *Cancer research* 50 (3 Suppl), S.1011–1013.
- Parsons, H. L.; Earnshaw, J. C.; Wilton, J.; Johnson, K. S.; Schueler, P. A.; Mahoney, W.; McCafferty, J. (1996): Directing phage selections towards specific epitopes. In: *Protein engineering* 9 (11), S. 1043–1049.
- Peterson, Luke F.; Zhang, Dong-Er (2004): The 8;21 translocation in leukemogenesis. In: *Oncogene* 23 (24), S. 4255–4262.
- Qi, Huan; Lu, Haiqin; Qiu, Hua-Ji; Petrenko, Valery; Liu, Aihua (2012): Phagemid vectors for phage display. Properties, characteristics and construction. In: *Journal of molecular biology* 417 (3), S. 129–143.

- Qiang, Xu; Sun, Keyong; Xing, Lijun; Xu, Yifeng; Wang, Hong; Zhou, Zhengpin et al. (2017): Discovery of a polystyrene binding peptide isolated from phage display library and its application in peptide immobilization. In: *Scientific reports* 7 (1), S. 2673.
- Ramos-Vara, J. A.; Beissenherz, M. E. (2000): Optimization of immunohistochemical methods using two different antigen retrieval methods on formalin-fixed paraffin-embedded tissues. Experience with 63 markers. In: *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* 12 (4), S. 307–311.
- Ricart, Alejandro D. (2011): Antibody-drug conjugates of calicheamicin derivative. Gemtuzumab ozogamicin and inotuzumab ozogamicin. In: *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 17 (20), S. 6417–6427.
- Robertson, David; Savage, Kay; Reis-Filho, Jorge S.; Isacke, Clare M. (2008): Multiple immunofluorescence labelling of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue. In: *BMC cell biology* 9, S. 13.
- Romano, Paolo; Manniello, Assunta; Aresu, Ottavia; Armento, Massimiliano; Cesaro, Michela; Parodi, Barbara (2009): Cell Line Data Base. Structure and recent improvements towards molecular authentication of human cell lines. NALM-6. In: *Nucleic acids research* 37 (Database issue), S. 925-32.
- Rondot, S.; Koch, J.; Breitling, F.; Dübel, S. (2001): A helper phage to improve single-chain antibody presentation in phage display. In: *Nature biotechnology* 19 (1), S. 75–78.
- Rosenberg, Steven A.; Yang, James C.; Restifo, Nicholas P. (2004): Cancer immunotherapy. Moving beyond current vaccines. In: *Nature medicine* 10 (9), S. 909–915.
- Ruan, Weiming; Sassoon, Adam; An, Feng; Simko, Jeff P.; Liu, Bin (2006): Identification of clinically significant tumor antigens by selecting phage antibody library on tumor cells in situ using laser capture microdissection. In: *Molecular & cellular proteomics : MCP* 5 (12), S. 2364–2373.
- Russel, M., Lowman, H. B., Clackson, T., and Al, E. T. (2004) Chapter 1: Introduction to phage biology and phage display., Oxford University Press, New York. S.1–26,
- Rust, Steven; Guillard, Sandrine; Sachsenmeier, Kris; Hay, Carl; Davidson, Max; Karlsson, Anders et al. (2013): Combining phenotypic and proteomic approaches to identify membrane targets in a 'triple negative' breast cancer cell type. In: *Molecular cancer* 12, S. 11.
- Sánchez-Martín, David; Sørensen, Morten Dræby; Lykkemark, Simon; Sanz, Laura; Kristensen, Peter; Ruoslahti, Erkki; Álvarez-Vallina, Luis (2015): Selection strategies for anticancer antibody discovery. Searching off the beaten path. In: *Trends in biotechnology* 33 (5), S. 292–301.
- Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74 (12), S. 5463–5467.
- Schlenk, Richard F.; Döhner, Konstanze; Krauter, Jürgen; Fröhling, Stefan; Corbacioglu, Andrea; Bullinger, Lars et al. (2008): Mutations and treatment outcome

- in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. In: *The New England journal of medicine* 358 (18), S. 1909–1918.
- Schmid, C.; Schleuning, M.; Hentrich, M.; Markl, G. E.; Gerbitz, A.; Tischler, J. et al. (2008): High antileukemic efficacy of an intermediate intensity conditioning regimen for allogeneic stem cell transplantation in patients with high-risk acute myeloid leukemia in first complete remission. In: *Bone marrow transplantation* 41 (8), S. 721–727.
- Schneider, Constanze; Oellerich, Thomas; Baldauf, Hanna-Mari; Schwarz, Sarah-Marie; Thomas, Dominique; Flick, Robert et al. (2017): SAMHD1 is a biomarker for cytarabine response and a therapeutic target in acute myeloid leukemia. In: *Nature medicine* 23 (2), S. 250–255.
- Sehgal, Alison; Whiteside, Theresa L.; Boyiadzis, Michael (2015): Programmed death-1 checkpoint blockade in acute myeloid leukemia. In: *Expert opinion on biological therapy* 15 (8), S. 1191–1203.
- Sergeeva, Anna; Kolonin, Mikhail G.; Molldrem, Jeffrey J.; Pasqualini, Renata; Arap, Wadih (2006): Display technologies. Application for the discovery of drug and gene delivery agents. In: *Advanced drug delivery reviews* 58 (15), S. 1622–1654.
- Shi, S. R.; Imam, S. A.; Young, L.; Cote, R. J.; Taylor, C. R. (1995): Antigen retrieval immunohistochemistry under the influence of pH using monoclonal antibodies. In: *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society* 43 (2), S. 193–201.
- Shi, Shan-Rong; Liu, Cheng; Balgley, Brian M.; Lee, Cheng; Taylor, Clive R. (2006): Protein extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. Quality evaluation by mass spectrometry. In: *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society* 54 (6), S. 739–743.
- Shlush, Liran I.; Zandi, Sasan; Mitchell, Amanda; Chen, Weihsu Claire; Brandwein, Joseph M.; Gupta, Vikas et al. (2014): Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. In: *Nature* 506 (7488), S. 328–333.
- Shukla, Girja S.; Krag, David N. (2005): Phage display selection for cell-specific ligands. Development of a screening procedure suitable for small tumor specimens. In: *Journal of drug targeting* 13 (1), S. 7–18.
- Sidhu, Sachdev S.; Lowman, Henry B.; Cunningham, Brian C.; Wells, James A. (2003): Phage Display for Selection of Novel Binding Peptides. In: *Methods in Enzymology* (328), S. 333–363.
- Smith, G. (1985): Filamentous fusion phage. Novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. In: *Science* 228 (4705), S. 1315–1317.
- Smith, George P.; Petrenko, Valery A. (1997): Phage Display. In: *Chem. Rev.* 97 (2), S. 391–410.
- Southam, C. M.; Craver, L. F.; Dargeon, H. W.; Burchenal, J. H. (1951): A study of the natural history of acute leukemia with special reference to the duration of the disease and the occurrence of remissions. In: *Cancer* 4 (1), S. 39–59.
- Sun, Yujing; Shukla, Girja S.; Kennedy, Guy G.; Warshaw, David M.; Weaver, Donald L.; Pero, Stephanie C. et al. (2009): Biopanning Phage-Display Libraries on Small Tissue Sections Captured by Laser Capture Microdissection. In: *Journal of biotech research* 1, S. 55–63.

- Sun, Yujing; Shukla, Girja S.; Weaver, Donald; Pero, Stephanie C.; Krag, David N. (2009): Phage-display selection on tumor histological specimens with laser capture microdissection. In: *Journal of Immunological Methods* 347 (1-2), S. 46–53.
- Sundberg, E. J.; Urrutia, M.; Braden, B. C.; Isern, J.; Tsuchiya, D.; Fields, B. A. et al. (2000): Estimation of the hydrophobic effect in an antigen-antibody protein-protein interface. In: *Biochemistry* 39 (50), S. 15375–15387.
- Sundberg, Eric J.; Mariuzza, Roy A. (2002): Molecular recognition in antibody-antigen complexes. In: *Advances in protein chemistry* 61, S. 119–160.
- Ternynck, Thérèse; Avrameas, Stratis (1990): [55] Avidin-biotin system in enzyme immunoassays. Bd. 184: Elsevier. In: *Methods in Enzymology*, S. 469–481.
- Tomlinson, I.: Human Single Fold scFv Libraries I+J (Tomlinson I+J) Protocol. Online verfügbar unter: <http://lifesciences.sourcebioscience.com/media/143421/tomlinsonij.pdf>.
- Tsumoto, K.; Caaveiro, J. M. M. (2016): Antigen-Antibody Binding. In: *eLS. John Wiley & Sons, Ltd.: Chichester*.
- Tur, Mehmet Kemal; Rothe, Achim; Huhn, Michael; Goerres, Ute; Klimka, Alexander; Stöcker, Michael et al. (2003): A novel approach for immunization, screening and characterization of selected scFv libraries using membrane fractions of tumor cells. In: *International journal of molecular medicine* 11 (4), S. 523–527.
- Vorup-Jensen, Thomas (2012): On the roles of polyvalent binding in immune recognition. Perspectives in the nanoscience of immunology and the immune response to nanomedicines. In: *Advanced drug delivery reviews* 64 (15), S. 1759–1781.
- Wang, Wei; Singh, Satish; Zeng, David L.; King, Kevin; Nema, Sandeep (2007): Antibody structure, instability, and formulation. In: *Journal of pharmaceutical sciences* 96 (1), S. 1–26.
- Watkins, Nicholas A.; Ouwehand, Willem H. (2000): Introduction to Antibody Engineering and Phage Display. In: *Vox Sanguinis* 78 (2), S. 72–79.
- Willman, C. L. (1999): Molecular evaluation of acute myeloid leukemias. In: *Seminars in hematology* 36 (4), S. 390–400.
- Winter, G.; Griffiths, A. D.; Hawkins, R. E.; Hoogenboom, H. R. (1994): Making antibodies by phage display technology. In: *Annual review of immunology* 12, S. 433–455.
- Wu, Si; Ke, Ailong; Doudna, Jennifer A. (2007): A fast and efficient procedure to produce scFvs specific for large macromolecular complexes. In: *Journal of Immunological Methods* 318 (1-2), S. 95–101.
- Zentrum für Krebsregisterdaten des Robert-Koch-Instituts & Kompetenznetz-Leukämie [http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Leukaemien/leukaemien\\_node.html](http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Leukaemien/leukaemien_node.html). Stand: 2017

## Anhang

### Verwendete Primer der ortsgerichteten Mutagenese

Herstellung der Primerpaare mittels Lasergene Core Suite Software von DNA-STAR

Primer	Sequenz
B4 3'	GTGTCAAACCACCAGACTGAGAAATAGTTGAGAC
B4 5'	GTCTCAACTATTTCTCAGTCTGGTGGTTTGACAC
G2 3'	GAGTCTGCGTACGTTGTCTGCGCACCAGACCGAG
G2 5'	CTCGGTCTGGTGCAGACAACGTACGCAGACTC

### Kanonische Aminosäuren und deren Einbuchstabencode/Symbol

Aminosäure	Symbol
Alanin	A
Arginin	R
Asparagin	N
Asparaginsäure	D
Cystein	C
Glutamin	Q
Glutaminsäure	R
Glycin	G
Histidin	H
Isoleucin	I
Leucin	L
Lysin	K
Methionin	M
Phenylalanin	F
Prolin	P
Serin	S
Threonin	T
Tryptophan	W
Tyrosin	Y
Valin	V

**Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

Gießen, den

Anna-Maria Rossner

**Danksagung**

Mein Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Stefan Gattenlöhner, Leiter des Instituts für Pathologie Gießen, für die Möglichkeit zur Promotion und die Unterstützung während meiner Arbeit.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Mehmet Kemal Tur, Leiter der Forschungsgruppe experimentelle Pathologie und Immuntherapie, für die Vergabe dieses interessanten Themas. Weiterhin vielen Dank für die Nutzung des Labors und sämtlicher zur Verfügung gestellter Materialien, die konstruktiven Beiträge und hilfreiche Unterstützung sowie für das intensive Korrekturlesen der schriftlichen Ausarbeitung meiner Arbeit.

Mein größter Dank gilt meinen Kollegen innerhalb der Arbeitsgruppe, Andre ten Haaf, Sibylle Pscherer und Teresa Wiemann, ohne deren Hilfsbereitschaft und Engagement sowie dem ständigen motivierenden Austausch auf fachlicher, aber auch persönlicher Ebene, das Anfertigen meiner Arbeit nur sehr schwer möglich gewesen wäre. Herzlichen Dank für diese äußerst angenehme und einzigartige Arbeitsatmosphäre.

Weiterhin möchte ich mich bei den freundlichen und hilfsbereiten Mitarbeitern des pathologischen Instituts für ihre Unterstützung bedanken. Namentlich genannt seien an dieser Stelle Frank Dönges, Sebastian Schäfer, Katharina Sack und Dr. Alexander Brobeil.

Aus tiefem Herzen möchte ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und meiner Schwester sowie meinem langjährigen Lebenspartner, für ihre immerwährende liebevolle Unterstützung, ihre stetige Motivation und ihr bedingungsloses Vertrauen in mich danken.