

Katharina Fries

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)



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

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2017

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2017

© 2017 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition linguistique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**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)**

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

vorgelegt von

Katharina Fries
aus Siegen

Gießen 2017

Aus dem Institut für Pathologie der
Justus-Liebig-Universität Gießen

Direktor: Prof. Dr. Stefan Gattenlöhner

Gutachter: Prof. Dr. Gattenlöhner

Gutachter: Prof. Dr. Wimmer

Tag der Disputation: 17.08.2017

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Das Bronchialkarzinom	1
1.1.1	Epidemiologie und Ätiologie.....	1
1.1.2	Histopathologische Klassifizierung	1
1.1.3	Disseminierung und Metastasierung.....	2
1.1.4	Molekulare (Genetische) Veränderungen beim Bronchialkarzinom	3
1.1.5	Diagnostik, Prognose und Therapie des Bronchialkarzinoms	6
1.2	Monoklonale Antikörper – bisheriger Stand	12
1.2.1	Herstellung von monoklonalen Antikörpern	12
1.2.2	Bisherige Anwendung von monoklonalen Antikörpern	14
1.2.3	Antikörper in der Immuntherapie	15
1.3	Phage-Display als Herstellungsverfahren von monoklonalen Antikörpern.....	18
1.3.1	Selektionieren und Testen der Antikörper-Bibliotheken	20
1.3.2	Die Tomlinson-Bibliothek	24
2	Zielsetzung.....	26
3	Material.....	28
3.1	Geräte und Software	28
3.2	Puffer, Lösungen, Medien und Agarplatten.....	30
3.3	Chemikalien und Verbrauchsmaterial	32
3.4	Antibiotika	32
3.5	Bakterienstämme	33
3.6	Zelllinien und Gewebe.....	33
3.7	Antikörpergenbibliothek und Helferphagen	34
3.8	Vektoren, Primer und Oligonukleotide.....	34
3.9	Enzyme und Reaktionskits	35
3.10	Antikörper.....	36
3.11	Molekulargewichtsmarker	36
3.12	Material für den Western Blot	36
4	Methoden.....	38
4.1	Zellbiologische Methoden	38
4.1.1	Kultivierung der benötigten eukaryontischen Zelllinien	38
4.1.2	Herstellung von Membranfragmenten	39

4.2	Phage-Display.....	40
4.2.1	Phagerescue aus den Tomlinson Bibliotheken I und J.....	40
4.2.2	Depletion und Selektion	42
4.2.3	Analyse der Anreicherung spezifischer scFv-Phagen im Durchflusszytometer	45
4.2.4	Herstellung der Masterplatten und monoklonaler ELISA	46
4.2.5	Plasmid Mini Präparation	48
4.2.6	Nachweis von scFv Sequenzen in den Plasmiden der Einzelklone	48
4.2.7	Sequenzierung und ortsgerichtete Mutagenese.....	49
4.2.8	Hitzeschocktransformation in kompetente Bakterien und Kolonie-PCR	51
4.2.9	Gelextraktion, Umklonierung in den Vektor pMS2 und Hitzeschocktransformation in XL1-Blue	53
4.2.10	Transfektion in HEK-Zellen.....	55
4.2.11	Testung der produzierten Antikörper.....	56
5	Ergebnisse.....	60
5.1	Anreicherungsfaktor der scFv-Phagen auf FFPE-Schnitten.....	60
5.2	Überprüfung der Anreicherung SCLC-spezifischer Phagen-Antikörper in der polyklonalen Durchflusszytometrie.....	61
5.3	Monoklonaler ELISA	67
5.4	Monoklonaler ELISA der Kompressionsplatte.....	68
5.5	Sequenzierung	70
5.6	Transfektionseffizienz der HEK-Zellen.....	71
5.7	Western Blot	72
5.8	Coomassie-Färbung.....	73
5.9	Monoklonaler ELISA der scFv-Fusionsproteine auf der Zelllinie NCI-H82	74
5.10	Überprüfung der Bindeaktivität der scFv-Fc-Fusionsproteine mittels Durchflusszytometrie.....	75
6	Diskussion	78
6.1	Verwendung der Phage-Display-Technologie.....	78
6.2	Selektion auf FFPE-Gewebe und Antikörperdemaskierung.....	79
6.3	Anreicherungsfaktor der scFv-Phagen auf FFPE-Gewebe	81
6.4	Anreicherung SCLC-spezifischer Phagen-Antikörper in der polyklonalen Durchflusszytometrie.....	82
6.5	Monoklonaler ELISA auf Phagenebene	83
6.6	Sequenzierung	84
6.7	Monoklonaler ELISA der scFv-Fusionsproteine auf der Zelllinie NCI-H82	84

6.8	Antikörper-Durchflusszytometrie auf den Zelllinien	85
6.9	Ausblick - Diagnostische und therapeutische Anwendung von scFv-Fc-Fusionsproteinen.....	86
7	Zusammenfassung	89
8	Abkürzungsverzeichnis.....	91
9	Abbildungs- und Tabellennachweis.....	95
10	Literaturverzeichnis	96
11	Anhang.....	107
11.1	Mutagenese-Primer.....	107
12	Publikationsverzeichnis	108
13	Ehrenwörtliche Erklärung.....	109
14	Danksagung	110

1 Einleitung

1.1 Das Bronchialkarzinom

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Das Bronchialkarzinom weist mit 265.000 Todesfällen pro Jahr in Europa die höchste Mortalitätsrate einer Krebserkrankung auf. Dies entspricht 21 % aller Krebstodesfälle. Die geschätzte Inzidenz des Bronchialkarzinoms beträgt 410.000 Neuerkrankungen pro Jahr in Europa (\cong 11,9 % aller Krebsneuerkrankungen), womit es zu den am häufigsten diagnostizierten Krebserkrankungen gehört [1]. Auch weltweit zeigt das Bronchialkarzinom eine hohe Prävalenz [2]. In Deutschland betrifft jede dritte Tumorneuerkrankung die Lunge, sowohl bei Männern als auch bei Frauen [3]. Kleinzellige Bronchialkarzinome stellen 12-15 % der heute diagnostizierten Lungenkarzinome dar, wobei die Inzidenz leicht fällt. Als mögliche Erklärung für diese fallende Inzidenz wird unter anderem der sinkende prozentuale Anteil an Rauchern diskutiert [4]. Dennoch erkranken jährlich 7.000-8.000 Menschen in Deutschland an dieser Lungenkrebsart [5]. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei über 70 Jahren [6].

Tabakrauch ist seit langem als Hauptrisikofaktor für die Entstehung von Bronchialkarzinomen bekannt [3, 7]. Berufliche Expositionen gegenüber kanzerogenen Stoffen wie z.B. Radon, Asbest oder ionisierender Strahlung spielen eine eher untergeordnete Rolle. Ein möglicher Einfluss von Umweltbelastungen ist noch Gegenstand aktueller Forschung [3].

1.1.2 Histopathologische Klassifizierung

Neben den kleinzelligen Bronchialkarzinomen (SCLC), die Eigenschaften von neuroendokrinen Zellen aufweisen, unterscheidet man drei große Subtypen der nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinome (NSCLC): Adenokarzinom, Plattenepithelkarzinom und großzellige Karzinome, von denen das Adenokarzinom am häufigsten zu finden ist. Diese Subtypen weisen größtenteils keine neuroendokrinen Eigenschaften auf [8, 9]. Obwohl für die Bronchialkarzinome diese diskreten Subtypen beschrieben sind, zeigen die Tumore häufig Aspekte mehrerer histologischer Phänotypen. Beispielsweise sind ca.

1-3 % aller SCLC-Fälle so genannte kombinierte SCLCs, da sie auch Eigenschaften der Adeno- oder Plattenepithelzellkarzinome aufweisen [8].

1.1.3 Disseminierung und Metastasierung

Bei der Metastasierung siedeln sich disseminierte Zellen auf dem Blut- (hämatogene Aussaat) oder Lymphweg (lymphogene Aussaat) in anderen Körperregionen ab [10, 11]. Das SCLC metastasiert früh, vor allem hämatogen [11]. Bevorzugte Metastasierungsorte sind Knochen und Gehirn [6]. NSCLC hingegen metastasieren deutlich später [12] und primär lymphogen [11]. Bei diesem Tumortyp können Metastasen in fast allen Körperregionen auftreten. Die häufigsten Lokalisationen sind Lymphknoten, ipsi- oder kontralaterale Lunge, Skelett, Leber, Nebennieren und ZNS [13].

1.1.3.1 Die minimale residuale Tumorerkrankung

Tumorzellen, die vom Tumor ausgehend im Körper disseminiert wurden oder weiterhin zirkulieren, sind seit längerem als Vorstufe von Fernmetastasen bekannt [14]. Sind solche Zellen nach Abschluss einer primär kurativen Therapie (pharmakologisch oder operativ) einzeln oder als Tumorzellverbände im Blut zirkulierend oder in Organsystemen, wie beispielsweise dem Knochenmark, bei Patienten nachweisbar, ohne dass noch klinische Zeichen eines Tumors erkennbar sind, spricht man auch von einer minimalen residualen Erkrankung oder minimalen Resterkrankung (MRD). Inzwischen wurden minimale Resterkrankungen als Hauptrisikofaktor für Rezidive beschrieben [14]. Die bemerkenswerte Fähigkeit von Bronchialkarzinomen trotz erfolgreicher lokaler oder systemischer Therapie zu rezidivieren, legt nahe, dass im Stadium der minimalen Resterkrankung eine Zellpopulation vorhanden sein könnte, die eine enorme Kapazität zur Selbsterneuerung und Regeneration besitzt [15]. In der Regel ist diese biologische Funktion jedoch auf somatische Stammzellen beschränkt, weshalb Zellen aus dieser Population auch als „Krebsstammzellen“ bezeichnet werden. Diese besondere Zellpopulation steht im Verdacht, Tumor-Potential zu besitzen, weshalb sie als potentielles therapeutisches Ziel in den Fokus gerückt ist. Einige

Strategien zum Ausschalten der Tumorstammzellen sind bereits in der klinischen Entwicklung. Von diesen verspricht man sich die Verzögerung oder Verhütung von Rezidiven [15].

Um einen dauerhaften Therapieerfolg zu erreichen, wird immer mehr in zielgerichtete systemische Therapeutika investiert, die für spezifische Subkollektive von Patienten eine optimal angepasste adjuvante Therapieform definieren können [16]. Durch Tumorthérapien, die auf der Verwendung von spezifischen Antikörpern basieren, könnten die Raten an minimalen Resterkrankungen und somit auch an Rezidiven gesenkt werden [17]. Durch ihre Spezifität gegenüber den Tumorzellen sind die Antikörper in der Lage, die zirkulierenden Tumorzellen zielgerichtet zu erkennen und zu eliminieren. Topp *et al.* veröffentlichten 2011 eine Studie in der 20 ALL-Patienten, bei denen nach einer Primärtherapie eine MRD nachgewiesen wurde, mit einer Monotherapie eines monoklonalen Antikörpers (Blinatumomab) therapiert wurden. 16 Patienten waren nach der Monotherapie MRD negativ, unter diesen auch 12 Patienten, die zuvor weder nach einer Hoch-Dosis-Chemotherapie noch nach einer kombinierten Chemotherapeutikagabe jemals MRD negativ waren [17]. Monoklonale Antikörper können also bei Patienten mit bisher therapieresistenter minimaler Resterkrankung eine Alternative bieten und so das Rückfall-freie Überleben verlängern [17].

1.1.4 Molekulare (Genetische) Veränderungen beim Bronchialkarzinom

In einer Übersichtsarbeit aus dem Jahre 2011 wurde der aktuelle Kenntnisstand der Mechanismen der Krebsentstehung von Douglas Hanahan und Richard A. Weinberg zusammengefasst [18]. Die Forscher stellten die lineare Krebsentstehung nach strikten Regeln und Selektionskriterien in Frage und äußerten stattdessen die These, dass Krebszellen vielmehr durch bestimmte „Markenzeichen“ charakterisiert werden könnten. Zu diesen „Markenzeichen“ gehörten:

1. Dem programmierten Zelltod (der Apoptose) zu entkommen
2. Eine unabhängige Eigenversorgung mit Proliferationssignalen zu garantieren
3. Wachstumshemmende Signalwege zu unterdrücken
4. Das Einwandern in zellfremdes Gewebematerial zu ermöglichen

5. Die Angiogenese zu fördern, um so die Nährstoffversorgung zu sichern
6. Trotz Replikation Immortalität zu erreichen
7. Den Energiemetabolismus von aerob auf anaerob umzustellen
8. Und der Zerstörung durch das Immunsystem zu entkommen

Käfferlein und Brüning, die sich in Ihrer Übersichtsarbeit aus dem Jahr 2012 auf den Artikel von Hanahan und Weinberg (siehe [18]) bezogen, vermuteten, dass nicht alle, sondern etwa drei bis vier dieser Charakteristika gleichzeitig vorhanden sein müssten, um aus einer gesunden Zelle eine Krebszelle werden zu lassen [19]. Diese Theorie verdeutlicht, dass jede Krebserkrankung letztendlich einzigartig ist. Dies bedeutet, dass für zwei Personen mit exakt der gleichen Krebsentität, gleichem Krankheitsstadium und Differenzierungsgrad möglicherweise dennoch zwei verschiedene medikamentöse Behandlungen erforderlich sind, da die Krebszellen immer noch über individuelle molekulare Muster verfügen. Diese Theorie legt ebenfalls nahe, dass eine gezielte Behandlung dieser spezifischen Veränderungen eine hoffnungsvolle Strategie zur Krebstherapie darstellt [18, 19].

In vielen epithelialen Tumoren ist die Rezeptor-Tyrosinkinase epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) übermäßig aktiviert, was eine gesteigerte Proliferation bewirkt und weitere Tumor-fördernde Aktivitäten, wie Angiogenese, Metastasierung und Invasion von Tumorzellen sowie die Inhibierung der Apoptose, unterstützt [20]. Der Tumor ist also in der Lage sich selbst mit Wachstumsfaktoren zu versorgen, wie es der Punkt „unabhängige Eigenversorgung mit Proliferationssignalen“ nach Hanahan und Weinberg beschreibt. Aufgrund dessen ist EGFR ein viel versprechendes Angriffsziel für neue Therapeutika, wie zum Beispiel die Wirkstoffklasse der Tyrosinkinase-Inhibitoren [21]. Bei NSCLC kann eine EGFR-Expression in 80 % der Fälle nachgewiesen werden und ist mit einer schlechteren Prognose verknüpft [20].

Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) ist an der physiologischen Regulation der Angiogenese beteiligt. Aber auch bei der pathologischen Angiogenese von Tumoren findet sich VEGF [22, 23]. Durch diese Gefäßneubildung sichert sich der Tumor seine Nährstoffversorgung. Zurzeit befinden sich diverse VEGF-Inhibitoren in der klinischen Testung, auch zur Behandlung von Bronchialkarzinomen [22]. Einer dieser VEGF-Inhibitoren ist der monoklonale Antikörper Bevacizumab. In Kombination

mit Standardtherapeutika konnte für Bevacizumab ein klinischer Nutzen für Patienten mit fortgeschrittenen kolorektalen Karzinomen, Mamma- und Ovarialkarzinomen, Nierenkarzinomen, sowie NSCLC und Glioblastom gezeigt werden. Allerdings werfen weitere Studienergebnisse die Frage auf, ob eine längerfristige Verabreichung von Anti-VEGF-Therapeutika bis zur Progression der Erkrankung zu einem aggressiveren Tumorphänotyp führen könnte. Als Ursache dafür wird eine adaptive Ausweichreaktion des Tumors diskutiert [23, 24, 25]. Des Weiteren hätte der Einsatz von Bevacizumab in der adjuvanten Chemotherapie zu weniger vielversprechenden Ergebnissen geführt als erwartet. Diese Diskrepanz in der Effizienz der Anti-VEGF-Therapie legt nahe, dass frühe und fortgeschrittene Krankheitsstadien nicht wie bisher mit ähnlichen Behandlungsschemata therapiert werden sollten. Vielmehr scheint es notwendig, speziell für die frühen Krankheitsstadien neue adjuvante Therapieschemata zu entwickeln [23].

Auch manche Punktmutationen des Tumorsuppressorgens p53 sind mit einer schlechteren Prognose der Bronchialkarzinome verknüpft [26]. Diese p53-Mutationen kommen in ca. 50 % aller NSCLC-Fälle und sogar in 75-100 % der SCLC-Fälle vor [8]. Das p53-Gen, das auf Chromosom 17 liegt, ist an der Regulation des Zellzyklus beteiligt und löst bei Zellen mit beschädigter DNA die Apoptose aus. Sind die Tumorzellen homozygot für das mutierte p53-Gen, fehlt diese Inhibierung des Wachstums und Apoptose-Einleitung, wodurch das Tumorwachstum begünstigt wird. Das Unterdrücken von wachstumshemmenden Signalwegen und der Apoptose sind ebenfalls Kennzeichen von Krebszellen nach Hanahan und Weinberg. Dies macht p53 zu einem weiteren prognostischen Marker und interessantem Studienobjekt für zielgerichtete Therapien [26].

Als weitere molekulare Veränderungen sind erhöhte Telomerase-Aktivität (SCLC und NSCLC), fehlende p16-Expression und Ras-Mutationen (v. a. NSCLC) sowie BCL-2-Expression und fehlende RB-Expression (v.a. SCLC) [8]. Insbesondere durch die übermäßig aktivierte Telomerase gelingt es dem Tumor trotz Replikation Immortalität zu erreichen und so ein weiteres „Krebsmarkenzeichen“ nach Hanahan und Weinberg zu erfüllen [18].

1.1.5 Diagnostik, Prognose und Therapie des Bronchialkarzinoms

Symptomatik

Das Bronchialkarzinom verursacht im Frühstadium unspezifische Symptome wie Husten und Auswurf, die im Verlauf zunehmen. Später kommen Dyspnoe, Fieber, Thoraxschmerzen, Heiserkeit, Gewichtsverlust oder Zeichen der oberen Einflusstauung sowie Schluckstörungen hinzu [12]. Charakteristisch für das kleinzellige Bronchialkarzinom sind außerdem die Entstehung in den zentralen Atemwegen und vorwiegend endokrinologische paraneoplastische Syndrome wie z.B. SIADH oder das Cushing-Syndrom [6].

Diagnostik und Staging

Zum Nachweis einer thorakalen Raumforderung wird Röntgen- oder CT-Diagnostik des Thorax durchgeführt. Zur histologischen und zytologischen Sicherung der Diagnose und zum Staging eignen sich Bronchoskopie, transthorakale Punktion, Mediastinoskopie, Thorakotomie oder eine supraclaviculäre Lymphknoten-Feinnadelbiopsie [6, 27]. Das kleinzellige Bronchialkarzinom ist in der Immunhistochemie häufig positiv für folgende Marker: CD56, TTF-1, Chromogranin A, Synaptophysin [28]. Zur Suche nach Fernmetastasen eignen sich CT bzw. MRT von Abdomen und Schädel, sowie die Knochenszintigraphie. Es schließen sich Verfahren zum Nachweis der intrathorakalen Ausbreitung an, wie z.B. PET-CT.

Eine übliche Stadieneinteilung des kleinzelligen Bronchialkarzinoms erfolgt nach der Klassifikation der *Veterans Administration Lung Study* (siehe Tabelle 1). Man unterscheidet ein schweres Erkrankungsstadium mit Befall beider Thoraxhälften, Pleuraergüssen mit Nachweis maligner Zellen, Vena-Cava-superior-Syndrom oder Auftreten von Fernmetastasen (*Extensive Disease*) von einem Stadium mit einem auf einen Hemithorax begrenzten Primärtumor (*Limited Disease*, z.T. zusätzliche Abgrenzung einer *Very Limited Disease* ohne mediastinalen Lymphknotenbefall) [6, 12]. Etwa zwei Drittel der Patienten befinden sich bei Erstdiagnose bereits im Stadium

einer *Extensive Disease* [6]. Inzwischen empfiehlt sich jedoch sowohl für das SCLC als auch für das NSCLC die Anwendung der TNM-Klassifikation (Tabelle 2).

Tabelle 1: Klassifikation des SCLC nach der *Veterans Administration Lung Study*. Diese Tabelle zeigt die Zuordnung der Stadieneinteilung nach der *Veterans Administration Lung Study* zu den Merkmalen der TNM-Klassifikation.

Stadien der <i>Veterans Administration Lung Study</i>	Zuordnung zur TNM-Klassifikation
<i>Very Limited Disease</i>	T1-2, N0-1
<i>Limited Disease</i>	T3-4 und/oder N2-3
<i>Extensive Disease</i>	M1

Modifiziert nach [5]

Tabelle 2: TNM-Klassifikation der Bronchialkarzinome. Die Verwendung der TNM-Klassifikation der Bronchialkarzinome wird heute unter anderem aufgrund ihrer genaueren prognostischen Aussagekraft sowohl für das NSCLC als auch für das SCLC empfohlen [6]. Die Therapieempfehlungen der DGHO (Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie) orientieren sich jedoch bisher an der *Veterans Administration Lung Study* [6].

T (Tumor)	
Tx	Keine Beurteilung möglich
T0	Kein Primarius zu sichern
Tis	Carcinoma in situ
T1a: ≤ 2 cm T1b: 2-3 cm	Tumor infiltriert nicht die Pleura visceralis, bronchoskopisch keine Infiltration in Hauptbronchus
T2a: 3-5 cm T2b: 5-7 cm	Invasion des Stammbronchus oder der Pleura visceralis, Atelektase/obstruktive Pneumonie eines Segmentes
T3: > 7cm	Invasion von Thoraxwand, Zwerchfell, N. phrenicus, Pleura mediastinalis, Perikard, Stammbronchus bis zur Hauptkarina, Atelektase/obstruktive Pneumonie eines Segmentes
T4: jede Größe	Invasion von Mediastinum, Herz, Gefäßen, Trachea, Hauptkarina, N. laryngeus recurrens, Ösophagus, Wirbelkörper Metastase in anderem ipsilateralem Segment

N (Lymphknoten)	
Nx	Keine Beurteilung möglich
N0	Kein Befall von regionalen Lymphknoten nachweisbar
N1	Metastasen in ipsilateralen peribronchialen und/oder ipsilateralen hilären Lymphknoten
N2	Metastasen in ipsilateralen mediastinalen und/oder subkarinalen Lymphknoten
N3	Metastasen in kontralateralen mediastinalen und hilären Lymphknoten oder ipsi- oder kontralateralen Skalenus-Lymphknoten oder supraclaviculären Lymphknoten

M (Fernmetastasen)	
Mx	Keine Beurteilung möglich
M0	Keine Fernmetastasen nachweisbar
M1a	Lungenmetastasen in einem kontralateralen Lappen Tumor mit Pleura- oder Perikarderguss Pleuraknoten
M1b	Fernmetastasen

Modifiziert nach [12]

Therapie – Standardverfahren und Alternativen

Die Therapie beim kleinzelligen Bronchialkarzinom erfolgt stadienabhängig [6]. Im Stadium VLD kommen als Optionen eine kombinierte Radiochemotherapie oder eine primäre chirurgische Resektion mit adjuvanter Chemotherapie zur Verfügung. Als Chemotherapeutika werden beim kleinzelligen Bronchialkarzinom meist Cisplatin oder Carboplatin und Etoposid verwendet. Seltener werden Cyclophosphamid, Doxorubicin, Irinotecan, Topotecan oder Vinca-Alkaloide verwendet. Auch im LD Stadium ist der Therapieansatz kurativer Art. Standardtherapie ist hier die kombinierte Radiochemotherapie. Sowohl im VLD, als auch im LD Stadium wird eine prophylaktische Bestrahlung des Schädels durchgeführt [6]. Im ED Stadium erfolgt eine palliative medikamentöse Tumorthherapie, die ebenfalls durch Schädelbestrahlung ergänzt werden kann. Obwohl das kleinzellige Bronchialkarzinom aufgrund seiner hohen Zellteilungsrate und Wachstumsprogredienz gut auf Chemo- und Radiotherapie anspricht, treten Rezidive auch im LD Stadium häufig schon innerhalb der ersten beiden Jahre nach der Behandlung auf [6, 7, 11].

Da NSCLC meist lange lokal begrenzt wachsen, bevor sie metastasieren, ist hier die operative Therapie primär indiziert. Im Stadium IA-IIIB werden Segment- oder Lappenresektionen, ggf. mit adjuvanter Chemotherapie durchgeführt. Das Stadium IIIA wird mit Operationen und adjuvanter Chemo- oder Radiotherapie behandelt. Zur Therapie im Stadium IIIB wird die simultane Radiochemotherapie eingesetzt und im Stadium IV ist die Therapie palliativer Natur [12]. Zu beachten ist, dass die NSCLC im Vergleich zu SCLC nur moderat auf klassische Radio-/Chemotherapieverfahren ansprechen [11].

Tabelle 3: Klinische Stadiengruppierung des NSCLC. In dieser Tabelle werden die 5 verschiedenen UICC- (*Union internationale contre le cancer*) und TNM-Stadien des NSCLC und ihre 5-Jahres-Überlebensraten (5-JÜL) dargestellt. Für das UICC-Stadium IV ist keine 5-JÜL mehr angegeben, da die mittlere Lebenserwartung dann nur noch ca. 10-12 Monate beträgt.

UICC	TNM	5-Jahres-Überleben
Stadium IA	T1a-T1b, N0, M0	61 %
Stadium IB	T2a, N0, M0	38 %
Stadium IIA	T1a-T2a, N1, M0 oder T2b, N0, M0	36 %
Stadium IIB	T2b, N1, M0 oder T3, N0, M0	22-24 %
Stadium IIIA	T3, N1, M0 oder T4, N0, M0 oder T1a-T3, N2, M0	13 %
Stadium IIIB	T4, N2, M0 oder T1a-T4, N3, M0	5 %
Stadium IV	Jedes T, jedes N, M1a-M1b	-

Modifiziert nach [12]

Als zielgerichtete Therapie zur Inhibierung der Tumor-Angiogenese des NSCLC stehen derzeit unter anderem monoklonale Antikörper wie Bevacizumab und Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) wie Nintedanib zur Verfügung [20, 22]. Für das seit 2006 für die NSCLC Therapie zugelassene Bevacizumab konnte in Kombination mit klassischen platinhaltigen Chemotherapeutika in 30 % der Fälle eine partielle Remission und dadurch ein längeres progressionsfreies Überleben gezeigt werden [12, 29, 30]. Seine Wirkung entfaltet Bevacizumab durch Bindung an den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF), wodurch die Tumorangioese beeinträchtigt wird (siehe auch 1.1.4, S. 3). Dieser Faktor zirkuliert im Blut und initiiert das Wachstum von Blutgefäßen. Tumorzellen bilden diesen Faktor, um ihre eigene Blutversorgung sicherzustellen. Nach Bindung von Bevacizumab an VEGF kann dieser nicht mehr mit dem VEGF-Rezeptor interagieren. Die Tumorzellen werden daraufhin schlechter mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt und so deren Wachstum gehemmt. Derzeit wird Bevacizumab in Kombination mit klassischen Chemotherapeutika vor allem bei metastasierten oder fortgeschrittenen Tumorerkrankungen sowie bei Rezidiven eingesetzt. In einer Studie der European Medicines Agency wurde die Wirkung von Bevacizumab bei 878 Patienten untersucht. Hierbei zeigte sich, dass bei fortgeschrittenen, metastasierten oder rezidivierenden Lungentumoren die durchschnittliche Gesamtüberlebenszeit von 10,3 Monate bei alleiniger platinhaltiger

Chemotherapie auf 12,3 Monate bei Kombinationstherapie mit Bevacizumab verbessert werden konnte [31].

Als weitere Alternativen zu den klassischen Chemotherapeutika konnten bisher sowohl monoklonale Antikörper, die gegen EGFR gerichtet sind, als auch ATP-kompetitive Inhibitoren der Tyrosinkinase (TKI) Aktivität gegen NSCLC zeigen [32]. Für Patienten mit hoher EGFR-Expression konnte so bereits ein verbessertes Überleben bei zusätzlicher Gabe des gegen den EGFR gerichteten monoklonalen Antikörper Cetuximab gezeigt werden [33]. Folgestudien mit Matuzumab, Panitumumab (beide gegen EGFR gerichtet) und Trastuzumab (gegen HER2/neu gerichtet) sind in Planung [20]. Weitere Studien zeigten eine antitumoröse Aktivität und einen Rückgang der Symptome unter dem EGFR-TKI Gefitinib, der inzwischen bereits in der Behandlung von Patienten mit NSCLC eingesetzt wird [21]. Dieser TKI der ersten Generation bindet dabei kompetitiv-reversibel an die Tyrosin-Kinase-Domäne des EGFR, wodurch die Zellen der Apoptose zugeführt werden [34]. In 10 % der Fälle lässt sich eine inkomplette Remission erzielen, in 40 % der Fälle stabilisiert sich die Erkrankung [12]. Das Auftreten von Resistenzen limitiert den Nutzen des Medikamentes jedoch entscheidend. Daher sind neue Medikamente, die diese Resistenzen verhindern oder beseitigen können, erforderlich [35]. Sogenannte Tyrosin-Kinase-Inhibitoren der 2. Generation, die eine irreversible und somit prolongierte Bindung an die Tyrosin-Kinase-Domäne ermöglichen (wie Afatinib, Dacomitinib und Neratinib) werden zur Zeit erprobt [34]. Erste Ergebnisse präklinischer Studien zeigten, dass diese TKI der 2. Generation in manchen Fällen in der Lage sind, auch Zellen zu töten, die gegen eine Therapie mit TKI der 1. Generation Resistenzen zeigten [34]. Unglücklicherweise ist der klinische Benefit von EGFR-TKIs an bestimmte Mutationen des Tumor-Zell-Genoms geknüpft [35]. So ist dieses Medikament vor allem bei Nicht-Rauchern und Asiaten wirksam, da dort häufig die entsprechende EGFR-Mutation vorliegt [36]. Für weitere Patientengruppen konnte noch kein eindeutiger Nutzen nachgewiesen werden [37, 38].

Die vielversprechenden Erfolge, die mit monoklonalen Antikörpern und Tyrosinkinase-Inhibitoren bei der Therapie des NSCLC erzielt wurden, konnten bisher beim SCLC nicht erreicht werden [39]. In einer Übersichtsarbeit von Zhang *et al.* aus dem Jahr 2013 kamen die Autoren zu dem Schluss, dass der Bedarf an zielgerichteten Therapien in der

Behandlung des SCLC nach wie vor groß sei [39]. Untersucht wurden unter anderem Substanzen, die die Angiogenese inhibieren, intrazelluläre Signalwege zur Proliferation der Zelle beeinflussen und die Apoptose induzieren. Mehrere der getesteten Substanzen erbrachten dabei keinen Vorteil hinsichtlich des Überlebens (wie z. B. Imatinib [40], Cediranib [41], Vandetanib [42] oder Gefitinib [43]) [39]. Bei anderen Substanzen kam es zum Auftreten von nicht-akzeptablen unerwünschten Arzneimittelwirkungen [39]. Chemotherapien zur Rezidivbehandlung sind ineffektiver als initiale Chemotherapien, da das SCLC über eine Reihe von Resistenzmechanismen verfügt [39]. Daher wurde in einer Studie die Gabe von Biridocar (Multiple Drug Resistance Inhibitor VX-710) zur herkömmlichen Chemotherapie getestet. Dabei stellte sich diese Therapie als wenig effektiv heraus, führte aber zugleich bei einigen Patienten zu schweren Neutropenien und Todesfällen infolge von Septitiden, weshalb die Studie vorzeitig beendet wurde [39, 44].

Neben diesen wenig erfolgversprechenden Substanzen, befinden sich zur Zeit einige weitere zielgerichtete Therapien gegen SCLC in klinischen Studien, wie zum Beispiel Inhibitoren des Insulin-like growth factor Rezeptors (IGFR) [39]. Vielversprechende Ergebnisse liegen zurzeit vor allem für den Einsatz von Bevacizumab vor [39]. Da kleinzellige Bronchialkarzinome besser vaskularisiert sind als NSCLC [45] und den Wachstumsfaktor VEGF autokrin sezernieren [46], könnte sich der VEGF-Inhibitor Bevacizumab für die Therapie des SCLC eignen [39]. Auch wenn einige Studien eine Verbesserung der 1- und 2-Jahresüberlebensraten zeigten [47], konnte eine signifikante Verbesserung der mittleren Überlebenszeit in anderen Studien nicht bestätigt werden [48]. Hinzu kommt, dass für Bevacizumab einige relevante unerwünschte Arzneimittelwirkungen bestehen, aufgrund derer viele Patienten mit SCLC in den Studien nicht berücksichtigt werden konnten wie z. B.: Hämoptysen, unbehandelte Hirnmetastasen und Koagulopathien [48, 49]. Zusammenfassend kommen Zhang *et al.* in ihrer Übersichtsarbeit zu dem Schluss, dass Bevacizumab zum Teil vielversprechende Studienergebnisse lieferte, aber man noch weit von einem Durchbruch in der Therapie des SCLC entfernt sei, sodass weitere Forschung auf dem Gebiet der zielgerichteten SCLC-Therapien notwendig ist [39].

Prognose

Das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom zeigt 5-Jahres-Überlebensraten zwischen 61 % (Stadium IA nach UICC) und 5 % (Stadium IIIB). Im Stadium IV beträgt die mittlere Lebenserwartung ca. 10-12 Monate [12]. Zur Übersicht über die 5-Jahres-Überlebensraten der UICC- und TNM-Stadien des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms siehe auch Tabelle 3 (s. S. 9).

Das kleinzellige Bronchialkarzinom unterscheidet sich von anderen Bronchialkarzinomtypen durch seinen aggressiven klinischen Verlauf und gehäuftes Auftreten von paraneoplastischen Syndromen [50], sowie durch eine schnelle Tumor-Verdopplungszeit und frühzeitiges Auftreten von Fernmetastasen [7]. Insgesamt geht diese Erkrankung mit einer hohen Todesrate innerhalb des ersten Jahres nach Diagnosestellung einher [6]. Zur Verbesserung der Überlebensrate sollte die Diagnose spätestens 2 Monate nach Symptombeginn gestellt und die Behandlung binnen 6 Wochen begonnen werden [27]. Die 5-Jahres-Überlebensrate im VLD-Stadium liegt je nach Lymphknotenbefall bei 35-70 %, im LD-Stadium bei 20-25 % [6]. Bei Patienten im extensiven Stadium finden sich in 21,6 % der Fälle Hirnmetastasen, die sich negativ auf das Überleben auswirken können [51]. Trotz intensiver Forschung stieg die 2-Jahres-Überlebensrate von Patienten mit kleinzelligen Bronchialkarzinomen im extensiven Stadium von 1,5 % im Jahr 1973 auf nur 4,6 % im Jahr 2000 [4]. Für viele ältere Patienten ist die Therapie schlecht verträglich und gemeinsam mit dieser sehr schlechten Überlebensrate besonders im ED-Stadium zeigt sich, dass neue und verträglichere Therapieansätze für viele Patienten einen Benefit bringen könnten. Um einen dauerhaften Therapieerfolg zu erreichen und minimale Resterkrankungen zu therapieren, scheint die zielgerichtete Gabe von spezifisch angepassten Therapeutika sinnvoll.

1.2 Monoklonale Antikörper – bisheriger Stand

1.2.1 Herstellung von monoklonalen Antikörpern

Prinzipien zur Herstellung monoklonaler Antikörper wurden erstmals 1975 von Georges Köhler und César Milstein publiziert [52], die dafür 1984 gemeinsam mit Niels Kaj

Jerne mit dem Nobelpreis für Medizin oder Physiologie ausgezeichnet wurden [53]. Jerne entwickelte bereits 1955 grundlegende Theorien für die mögliche Herstellung von monoklonalen Antikörpern [54]. Auch schon zuvor wurden Antikörper nach Immunisierung von Tieren in Form von Antisera gewonnen und für diagnostische und seltener für therapeutische Zwecke (z. B. Diphtherieantiserum) eingesetzt [55]. Diese polyklonalen Seren wiesen jedoch auch eine größere Anzahl an nicht-spezifischen Bindern auf [56]. Zudem variierte die Menge der spezifischen Antikörper von Herstellungsprozess zu Herstellungsprozess deutlich, sodass jede neue Charge zunächst auf ihre Spezifität getestet werden musste [56]. Bei der Verwendung von rekombinanten Antikörpern bleiben diese im Gegensatz dazu über viele Produktionsrunden hinweg stabil, d. h. es wird immer exakt der gleiche Antikörper hergestellt [56].

Das von Köhler und Milstein entwickelte Verfahren ist unter dem Namen Hybridom-Technik bekannt [52, 55]. Dabei werden Mäuse mit einem gewünschten löslichen oder zellulären Antigen infiziert. Infolgedessen nimmt die Anzahl spezifischer B-Lymphozyten in Milz und Lymphknoten der Tiere zu. Diese spezifischen B-Lymphozyten werden entnommen, isoliert und mit Hilfe von Fusionsvermittlern *in vitro* mit speziellen Zelllinien zum so genannten Hybridom verschmolzen. Dafür werden häufig Plasmazytomzellen verwendet, die einen Gendefekt tragen, der eine spätere Selektion möglich macht. Von den Plasmazytomzellen erhält das Hybridom die Fähigkeit zum unbegrenzten Wachstum im Reagenzglas. Ein möglicher Gendefekt ist das Fehlen der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT), die die Purinbasen Adenin und Guanin synthetisiert. Als Selektionsmedium wird beispielsweise HAT-Medium eingesetzt, welches Hypoxanthin, Thymidin und Aminopterin enthält. Nach Zugabe des Zellgiftes Aminopterin (Folsäure-Analogon) werden alternative Synthesewege für die Purinbasen Guanin und Adenin blockiert. Somit können dann nur die Zellen überleben, die von den isolierten spezifischen B-Zellen ein funktionstüchtiges HGPRT übernommen hatten, um so die toxische Wirkung des Aminoptersins außer Kraft zu setzen. Da Aminopterin auch die Synthese von Thymidin blockiert, muss dieses dem Medium zugesetzt werden. Die nicht-fusionierten Myelomzellen sterben im HAT-Medium ab, da sie diesen alternativen Stoffwechselweg über HGPRT nicht verfolgen können. Die nicht-fusionierten B-Lymphozyten sterben ebenfalls nach einer Zeit ab, da ihre Lebenszeit im Reagenzglas begrenzt ist. So sind

nach diesem Selektionsverfahren nur noch Hybridomzellen in der Kultur enthalten, die dann vereinzelt werden. Aus dem Überstand der Zellen können nun Antikörper gewonnen und aufgereinigt werden, um sie anschließend auf ihre Spezifität zu testen. Da die Antikörper-produzierenden Zellen alle von der gleichen Mutterzelle ausgehen, bezeichnet man die Antikörper als monoklonal [52, 55].

Moderne Verfahren zur monoklonalen Antikörper-Herstellung kommen zum Teil ohne zweckgerichtete Immunisierung aus, wie beispielsweise die Phage-Display-Methode (s. S. 18). Als weiteres modernes Antikörperherstellungsverfahren ist die Human-Immunglobulin-Transgene Maus-Technologie zu nennen. Bei letztgenannter Methode werden für die Produktion humaner Immunglobuline (Ig) transgene Mäuse immunisiert, wodurch primär humane Antikörper entstehen [55]. Eine solche Transgene Maus-Technologie ist die XenoMaus Technologie. Bei dieser Technologie werden nahezu alle menschlichen Immunglobulin-Loci in die Keimbahn von Mäusen eingeführt und die Produktion von mauseigenen Antikörpern unterdrückt. So werden Sicherheit und Effizienz dieser Medikamente verbessert. Aufgrund der Vielzahl an möglichen vollständig humanen Antikörperkandidaten, die mithilfe der XenoMaus Technologie generiert werden könnten, erhofft man sich von dieser Methode auch neue Therapeutika für eine Vielzahl weiterer Erkrankungen [57]. Als vollständig humane Antikörper sind bisher unter anderem seit 2003 Adalimumab zur Therapie schwerer Arthritiden und des schweren Morbus Crohn [58] und seit 2007 Panitumumab zur Therapie des therapierefraktären kolorektalen Karzinoms zugelassen [57]. Aufgrund ihrer vollständig humanen Eigenschaften sind diese Antikörper durch eine sehr geringe Immunogenität und eine sehr geringe Wahrscheinlichkeit für Überempfindlichkeitsreaktionen gekennzeichnet [57].

1.2.2 Bisherige Anwendung von monoklonalen Antikörpern

Die Verwendung der zuerst zugelassenen murinen Antikörper beinhaltet das Risiko der Bildung von humanen Antimausantikörpern, die die Wirkung aufheben oder zu unerwünschten Nebenwirkungen führen können [55]. Durch B- und T-Zell-Epitope auf den Nagerproteinen können die murinen Antikörper eine immunogene Antwort im menschlichen Körper auslösen. Bei dieser Antwortreaktion entstehen so genannte

humane anti-Maus Antikörper (HAMA). Durch diese HAMA-Reaktion werden die murinen Antikörper im menschlichen Körper schneller abgebaut als Antikörper humanen Ursprungs. Dadurch ist die therapeutische Effizienz von murinen Antikörpern eingeschränkt [59]. Daher wird in Zukunft wohl vermehrt auf menschliche Proteinsequenzen gesetzt werden. Mit Hilfe der Phage-Display-Technologie werden vollständig humane Antikörper generiert, die nicht zur Bildung von HAMAs führen und somit effizienter eingesetzt werden können. Um die Gewebegängigkeit zu erhöhen, werden Antikörperbruchstücke bzw. Antikörperfragmente eingesetzt, die als so genannte scFv (*single chain variable fragment*) hergestellt werden. Außerdem ist es inzwischen möglich Antikörper mit Radionukliden, Zytokinen oder Toxinen zu konjugieren, um die Zielzellen gezielt zu beeinflussen oder auszuschalten [55]. Eingesetzt werden die monoklonalen Antikörper bisher vor allem bei Tumor- und Autoimmunerkrankungen sowie in der Kardiologie, bei Transplantationen und Infektionskrankheiten. So wird der Mensch/Maus-chimäre monoklonale Antikörper Rituximab beispielsweise bei Lymphomen, rheumatoider Arthritis und systemischem Lupus erythematoses verwendet. Das Zielmolekül von Rituximab ist CD20. Adalimumab ist dagegen ein humaner Antikörper und findet in der Therapie von rheumatoider Arthritis und Psoriasisarthritis Anwendung. Dieser Antikörper ist gegen den TNF gerichtet. Zudem sind noch diverse humanisierte und einige wenige murine Antikörper auf dem Markt [55].

In Studien wird zurzeit die einfachere subkutane Gabe erprobt, um die sonst notwendige intravenöse Applikation zu umgehen [55]. Der monoklonale Antikörper Trastuzumab ist für die subkutane Gabe bereits zugelassen [60]. Das Hauptproblem beim Einsatz von Antikörper-basierten Therapien stellt jedoch die Identifizierung eines diagnostisch und therapeutisch geeigneten Zielantigens dar. Dieses Problem wird auch von Carter *et al.* in einer Übersichtsarbeit aus dem Jahre 2004 dargestellt [61].

1.2.3 Antikörper in der Immuntherapie

In den letzten Jahren wurden diverse Proteine identifiziert, die auf der Oberfläche maligner Zellen aberrant exprimiert werden [62]. Antikörper und Antikörper-Fragmente können nicht-fusioniert als reine Antikörper eingesetzt werden, um diese spezifischen

Oberflächenmoleküle maligner Zellen zu erkennen und die entarteten Zellen gezielt zu bekämpfen. Dabei nutzen sie beispielsweise Signalkaskaden des Immunsystems wie die antikörperabhängige zellvermittelte Toxizität (ADCC), bei der zytotoxische Effektorzellen (wie NK-Zellen) zur Zielzelle gelenkt werden oder die komplementabhängige Zytolyse (CDC), die ebenfalls zum Tod der Zielzelle führt [63]. Die Antikörper können aber auch mit zytotoxischen Stoffen fusioniert werden, wodurch das Bekämpfen dieser Zielstruktur-tragenden Zellen weiter optimiert werden kann. Bei den ersten Antikörper-Konjugaten traten jedoch diverse Probleme auf: Die zytotoxischen Stoffe waren aufgrund ihres bakteriellen oder pflanzlichen Ursprungs immunogen oder nicht potent genug, um die Tumorzellen zu vernichten. Auch die schlechte Penetration dieser Konjugate ins Gewebe stellte hierbei einen limitierenden Faktor dar. Außerdem war die Verbindung zwischen Antikörper und Toxin zum Teil nicht stabil genug, um ausreichend lange im Blut zu zirkulieren und somit gemeinsam die soliden Tumorzellen zu erreichen. Letztendlich verblieben vier Strategien, um spezifische Antikörper, die mit zytotoxischen Stoffen konjugiert waren, einzusetzen [62].

1. Immuntoxine: Die ersten Agenzien, die an Antikörper geknüpft wurden, waren antivirale Proteine, pflanzliche und bakterielle Toxine [62]. Aufgrund der Immunogenität der murinen Antikörper, der systemischen Toxizität und der kurzen Verweildauer im Blutstrom, brachten diese Studien nur mäßigen Erfolg. Die Größe der Moleküle schien zudem die Penetration in solide Tumoren zu beschränken. Mit diesem zusätzlichen Wissen wurde eine zweite Generation von deutlich kleineren Immuntoxinen entwickelt. Dabei wurde die zytotoxische Domäne, beispielsweise von Pseudomonas Exotoxin A, an scFv-Fragmente fusioniert. Moxetumomab pasudotox ist ein solches Konjugat, das zurzeit in klinischen Studien zur Behandlung von B-Zell-Lymphomen getestet wird und sich gegen CD-22 richtet [64]. Bisher konnte im Vergleich zu Standardtherapeutika jedoch nur eine geringfügig bessere Rate kompletter Remissionen gezeigt werden. Das grundlegende Problem der Immunogenität der murinen Antikörper und die kurze Verweildauer im Blutstrom scheinen die therapeutische Potenz des Medikamentes weiterhin zu limitieren. Des Weiteren ist auch die maximale tolerable Dosis dieses Konjugats eher gering [62, 64].

Aufgrund der oben genannten systemischen Toxizität und Immunogenität von Toxinen, die aus Bakterien oder Pflanzen gewonnen werden, gibt es inzwischen Anstrengungen die nicht-humanen Toxine zu verlassen und durch so genannte humane Effektormoleküle zu ersetzen. Bei dieser Technik werden die Antikörper an proapoptische Enzyme, RNasen oder Rezeptoren, die den Zelltod herbeiführen, geknüpft [65].

2. Antikörper-Radionuklid-Konjugate: Das Ziel dieser Therapievariante ist es, lokal eine ausreichend hohe Dosis Radioaktivität zu erreichen, um so das Tumorgewebe präzise zu vernichten, ohne dabei das gesunde Gewebe zu zerstören. Außerdem könnten mit dieser Methode auch subklinische Metastasen durch radioaktive Strahlung therapiert werden. Für die Behandlung des Non-Hodgkin-Lymphoms wurden bereits zwei dieser Konjugate entwickelt. Die guten Ansprechraten der Lymphome auf die Behandlung mit ^{131}I -Tositumomab und ^{90}Y -Ibritumomab-Tiuxetan konnten allerdings in soliden Tumoren bisher nicht wiederholt werden, vermutlich aufgrund der geringeren Radiosensitivität dieser Zellen. Bisher liegen die maximalen Dosen an Radioaktivität, die mit Immunokonjugaten zu den Zellen dieser soliden Tumore transportiert werden konnten, noch im subtherapeutischen Bereich. [62]

3. Antikörper-Wirkstoff-Konjugate: Mithilfe dieser Methode sollen bereits bewährte Zytostatika gezielt an die Tumorzellen abgegeben werden, um so deren therapeutischen Index zu erweitern. Nach ersten gescheiterten Studien wurden die verwendeten murinen Antikörper durch humane oder humanisierte Antikörper ersetzt, um dadurch die Immunogenität zu senken. Außerdem wurden potentere Zytostatika verwendet. Die Oberflächenmoleküle, die als Zielstrukturen der Antikörper fungieren, finden sich in geringerem Ausmaß auch auf gesunden Zellen, sodass eine Zytotoxizität für gesunde Zellen nicht ausgeschlossen werden kann. Im Jahr 2000 erschien mit Gemtuzumab-Ozogamicin das erste zugelassene Medikament dieser Art. Allerdings wurde die Zulassung dieses Medikamentes 2010 von der FDA widerrufen, da die erhofften Erfolge in der Behandlung der akuten myeloischen Leukämie ausblieben. Zwei weitere Antikörper-Arzneimittel-Konjugate (Brentuximab Vedotin und Trastuzumab-Emtansine) zeigen jedoch eine vielversprechende Aktivität und sind inzwischen zur Behandlung von Lymphomen und Mammakarzinomen zugelassen. Einige weitere Medikamente dieser Klasse befinden sich ebenfalls in klinischen Studien. Bisher

scheinen die Patienten mit besonders hohen Expressionsraten des jeweiligen Zielantigens am meisten von dieser Therapieform zu profitieren. [62, 66, 67].

4. Antikörper-Enzym-Konjugate (ADEPT – antibody-directed enzyme prodrug therapy): Bei dieser Technik werden Antikörper mit Enzymen kombiniert und dann meist gemeinsam mit kleinen Prodrug-Molekülen verabreicht, die dann im Körper von den mitgelieferten Enzymen verstoffwechselt werden, um die biologisch aktive Substanz frei zu geben. Die kurze Halbwertszeit der Konjugate und die Immunogenität der bakteriellen Enzyme stellen jedoch Probleme bei dieser Methode dar, die eine langfristige Applikation erschweren [62, 68]. Die Verwendung von humanen Antikörpern in Kombination mit humanen zytotoxischen Liganden (wie beispielsweise Tumornekrosefaktoren, Granzym B oder Ribonukleasen) stellt dabei eine mögliche Alternative dar, um die Immunogenität zu reduzieren [68]. Die Auswahl der richtigen Proteasen ist dabei wichtig, um eine systemische Toxizität zu verhindern [68].

Probleme bei der Verwendung dieser Methoden sind die erschwerte Zugänglichkeit der soliden Tumorgewebe für Antikörper, ein heterogenes Expressionsmuster auf der Oberfläche der Tumorzellen, sowie Expression des Zielantigens auch in nicht-entarteten Geweben und damit einhergehende Nebenwirkungen. Des Weiteren muss der Tumor zuvor auf die Expression des Antigens getestet werden. Vorteile dieser Strategien sind das spezifische Binden an das Zielantigen und das selektive Applizieren der hochpotenten Arzneimittel sowie verminderte unerwünschte Arzneimittelwirkungen [62].

1.3 Phage-Display als Herstellungsverfahren von monoklonalen Antikörpern

Das menschliche Immunsystem ist in der Lage Milliarden verschiedener Antikörper zu generieren [69]. Die Antigen-Bindungsstelle der Antikörper besteht aus sechs hypervariablen Regionen, den so genannten complementarity determining regions (CDRs). Drei davon sind in der variablen Domäne der leichten Kette (V_L) enthalten und drei weitere in der variablen Domäne der schweren Kette (V_H). Das Immunsystem entwickelt ein Repertoire naiver B-Lymphozyten, von denen jede Zelle eine andere Antigen-Bindungsstelle aufweist. Nach Antigen-Exposition werden die Lymphozyten ausgewählt, deren Antikörper das Antigen erkannt haben. Bei diesem Vorgang wird der

Einbau von somatischen Mutationen in die variablen Regionen gefördert, der zu einer höheren Affinität führen soll [69, 70].

Das Selektieren spezifischer Antikörper kann aber auch im Labor mithilfe rekombinanter Antikörper-Bibliotheken erfolgen. Als Begründer dieser Technik gilt George P. Smith, der 1985 das Phage-Display als Methode zur Präsentation von Polypeptiden auf der Oberfläche von Bakteriophagen publizierte [70]. Inzwischen hat sich die Phage-Display-Technologie als effizientes Verfahren zur Produktion von Antikörpern in kurzer Zeit etabliert. Die Methode basiert auf der Expression von funktionellen Antikörperfragmenten auf der Oberfläche von Bakteriophagen, die dann anhand ihres Antigen-Bindungsverhalten isoliert werden können. Der hierfür am häufigsten verwendete Phage ist M13. Für dieses Verfahren sind vier Grundschritte nötig: 1. das Generieren einer großen genotypischen Vielfalt aus synthetischen Genen der variablen Domänen oder aus B-Zell-Klonen; 2. der Phänotyp und der dafür kodierende Genotyp müssen physikalisch miteinander verbunden werden; 3. das Anlegen eines Selektionsdrucks und 4. die gezielte Vermehrung (Amplifikation). Um Genotyp und Phänotyp aneinander zu koppeln, wird das kodierende Gen als Einzelstrang-DNA in das gleiche Virion kopiert, auf dessen Oberfläche das gewünschte Protein exprimiert wird. Im Gegensatz zum menschlichen Immunsystem werden die Antikörper hier nicht direkt nach ihrem Antigenbindungsverhalten ausgewählt, sondern durchlaufen mehrere Selektionsrunden mit Zielantigenen und Amplifikation *in vitro*. Erst nach diesen Runden werden die individuellen Klone auf ihre Antigen-Reaktivität getestet. Im Gegensatz zu anderen Display-Verfahren ist beim Phage-Display auch die Selektion auf ganzen Zellen, auf Geweben und in Tieren möglich [69, 71].

Die Antikörper, die an der Oberfläche des Phagen präsentiert werden sollen, können sowohl an das Nebenhüllprotein pIII, als auch an das Haupthüllprotein pVIII gebunden werden. Der Nachteil am Display auf pVIII ist, dass an pVIII nur Peptide mit einer Länge von sechs bis acht Aminosäuren geknüpft werden können [72]. Für größere Peptide stellt das pIII-Hüllprotein die bessere Alternative dar. Die gewünschte Sequenz wird nach der Signalpeptid-Sequenz eingefügt. Nachteilig bei der Darstellung an pIII ist jedoch, dass auf einem Phagen-Partikel nur maximal fünf Kopien des Wunschpeptides präsentiert werden können, da jeder Phagenpartikel nur fünf pIII Proteine enthält. Durch besonders große präsenzierte Peptide kann außerdem die Infektiosität der Phagen

gemindert werden. Dieses Problem kann jedoch durch die Verwendung von Hybridphagen umgangen werden. Dabei wird das Zielpeptid nur an eine pIII-Kopie geknüpft, wohingegen die anderen vier Moleküle mit dem Wildtyp-Protein fusioniert werden. Dies lässt sich durch die Verwendung eines Helferphagen erreichen [72, 73].

1.3.1 Selektionieren und Testen der Antikörper-Bibliotheken

Theoretisch besteht die Möglichkeit, einzelne rekombinante scFv- oder Fab-Antikörperfragmente aus den Antikörper-Bibliotheken direkt auf ihre Antigen-Bindungsaktivität zu testen. Allerdings sind die Bibliotheken zu groß und die Anzahl der spezifischen Binder vor der Selektion zu gering, um mit herkömmlichen Verfahren effektiv getestet werden zu können. Durch mehrere Selektionsrunden, bestehend aus Inkubation, Waschen, Rückgewinnung und Amplifizieren der gebundenen Phagen, können für das entsprechende Antigen spezifische Antikörper in der Bibliothek angereichert werden. Die physikalische Kopplung von Genotyp und Phänotyp ermöglicht die Sicherung der angereicherten Antikörper-Sequenzen jeder Selektionsrunde (z. B. durch Einfrieren), so dass diese als Ausgangsmaterial für weitere Selektionsrunden verwendet werden können. Damit das Antikörper-Fragment auf der Oberfläche des Phagen exprimiert werden kann, wird das dafür kodierende Gen im Leseraster an ein Hüllproteingen fusioniert und danach in einen Vektor kloniert, der bei der Synthese neuer Phagen-Partikel verpackt werden kann. Im Verlauf der drei Selektionsrunden erhöht sich die Häufigkeit der Antigen-reaktiven Binder, welche die Waschprozedur überstanden haben [69, 71].

Standardselektionen für die Phage-Display-Technologie finden auf Antigenen statt, die auf einer Plastikoberfläche immobilisiert wurden. Diese Methode bringt jedoch einige Nachteile mit sich: Zunächst muss das Antigen in aufgereinigter Form vorhanden sein [74]. Dies bedeutet auch, dass das Antigen vor der Selektion bereits bekannt sein muss. Gegen unbekannte Antigene gerichtete Selektionen, wie in dieser Arbeit, sind daher nicht möglich. Des Weiteren binden die auf diese Weise isolierten Antikörper zwar das aufgereinigte Antigen, erkennen dieses Antigen jedoch oft nicht in seiner nativen Form [74], da es während des Immobilisierungsvorganges zu Denaturierungen und somit Konformationsänderungen der Antigene kommen kann [75]. Auch die Selektion auf

Zelllinien bringt Probleme mit sich: Da die Zellen hier vereinzelt und in einem Zellkulturmedium vorliegen, befinden sich die Zellen nicht mehr in ihrer natürlichen Umgebung, wie sie *in vivo* vorliegt. Dadurch kann die Genexpression und somit auch die Antigenpräsentation auf der Zelloberfläche beeinflusst werden [76, 77].

Die Selektion auf FFPE-Gewebe bietet den Vorteil die Antikörper auf Tumorzellen zu selektionieren, die sich in ihrer natürlichen Umgebung befinden. Dadurch werden genetische und epigenetische Veränderungen, die die Präsentation von Oberflächenantigenen beeinflussen könnten verhindert [77]. In einigen wenigen Arbeiten wurden Phage-Display-Selektionen auf FFPE-Gewebeschnitten bereits angewendet. Neben einer unterschiedlichen Anzahl an Selektionsrunden und zum Teil anderen verwendeten Antikörper-Bibliotheken, unterschieden sich diese Studien vom geplanten Vorgehen in dieser Arbeit vor allem durch die Aufbereitung des FFPE-Gewebes. In den meisten dieser Versuche wurden die FFPE-Gewebeschnitte, nachdem die Phagen gebunden hatten, einer Laser-Mikrodissektion unterzogen, sodass sich im Anschluss daran nur noch entartetes Gewebe auf dem Objektträger befand und gesunde Gewebeanteile abgetragen wurden [77, 76, 78, 79, 80]. Teilweise wurden diese Technik auch an gefrorenen Geweben und nicht, wie in dieser Arbeit, an Patientenmaterial getestet [77, 76, 78]. In einer Arbeit wurden nach Bindung der Phagen die Objektträger mit UV-Licht bestrahlt, wobei die Gewebeanteile, die Zielzellen enthielten mit mikroskopisch kleinen Goldplättchen vor der Strahlung geschützt wurden [81]. So überlebten nur die Phagen, die an Zielzellen gebunden hatten. Bei den Verfahren, die auf Laser-Mikrodissektion basierten, zeigte sich, dass es zu großen Verlusten an Phagen kam - möglicherweise Aufgrund der Austrocknung des Gewebes [81]. Des Weiteren schienen die Phagen, die auf Laser-Mikrodissektions-Gewebe gebunden hatten, ihre Fähigkeit zur Infektion der Bakterien zu verlieren [77]. In einer weiteren Arbeit von Jarutat *et al.* wurde das FFPE-Gewebe nicht auf einem Objektträger, sondern frei im Falcon schwimmend eingesetzt [82]. Ein möglicher Nachteil der Selektionen auf FFPE-Gewebe ist, dass die gesuchten Antigene auf der Zelloberfläche wesentlich seltener vorkommen als unspezifische Antigene [74]. Dieses Problem kann durch Depletionen auf nicht-entartetem Gewebe, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurden, umgangen werden [74].

Abbildung 1 (siehe S. 22) zeigt das geplante Vorgehen im Rahmen dieser Arbeit:

Während der Depletion werden scFv-Phagen-Antikörper (rot und blau) auf nicht-entartetes Lungengewebe (hellgrün) gegeben. Dies soll die Anreicherung von Antikörpern gegen nicht krankheitsrelevante Antigene minimieren. Nach einer Inkubationszeit werden die nicht an das gesunde Gewebe gebundenen Phagen (rot) abgesaugt und zum Zielantigen gegeben. Das Zielantigen ist in diesem Fall das auf den Objektträgern fixierte Bronchialkarzinom-Gewebe (beige). Der Phagen-Antikörper kann dann während der Inkubation an ein Antigen binden. Nach dem Entfernen der

nicht gebundenen Phagen durch intensives Waschen, werden die Phagen, die an ein Antigen gebunden haben, abgelöst (eluiert) und anschließend mit diesen frische Bakterien infiziert. In den meisten Fällen sind mehrere Selektionsrunden nötig, um eine Anreicherung spezifischer Antikörper im Phagenpool zu erzielen. In dieser Arbeit wurden drei Runden mit Depletion und Selektion durchgeführt.

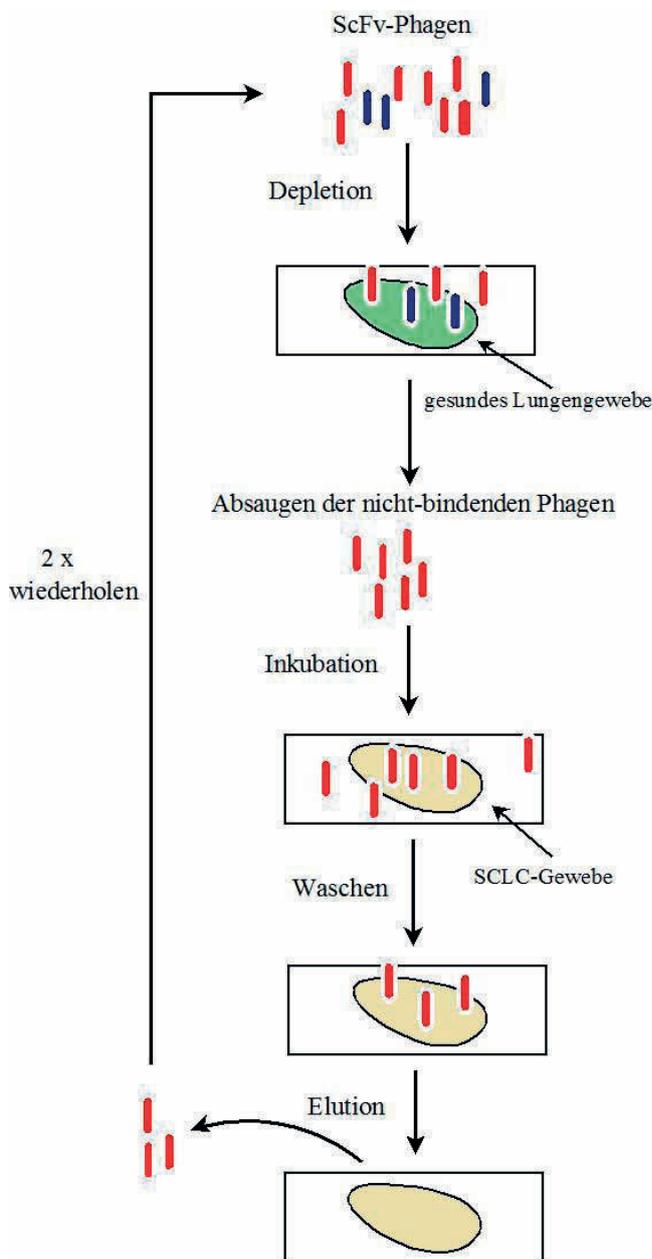


Abbildung 1: Schematische Darstellung einer Phage-Display Selektionsrunde: scFv-Phagen-Antikörper (rot: gegen SCLC-Gewebe gerichtet; blau: gegen gesundes Lungengewebe gerichtet) werden auf gesundem Lungengewebe (hellgrün) inkubiert. Die nicht-gebundenen (roten) scFv-Phagen-Antikörper werden abgesaugt und auf dem SCLC-Gewebe (beige) inkubiert. Nachdem die nicht-bindenden Phagen abgewaschen wurden, werden die spezifisch gebundenen Phagen eluiert und in zwei weiteren Selektionsrunden eingesetzt.

Je nach verwendetem Phagen werden das monovalente und das multivalente Display unterschieden. Beim monovalenten Display werden vor allem Antikörper mit höherer Affinität herausgefiltert. Dies wird durch eine direkte Fusion an das kleine Hüllprotein pIII unter Verwendung von phagemid-Vektoren erreicht. Die Effizienz der Selektion wird durch das multivalente Display gefördert. Häufig wird diese Form des Displays beim ersten Selektionsschritt eingesetzt und dann durch monovalentes Display abgelöst [69].

Auch in dieser Arbeit wurde in der ersten Selektionsrunde das multivalente Display benutzt, um die wenigen spezifischen Binder innerhalb der Ausgangsbibliothek zu erfassen. Um diese Multivalenz zu erreichen, wurde der so genannte Hyperphage eingesetzt [62]. Das virale Display ist bei Verwendung des Hyperphagen M13K07ΔpIII signifikant höher als bei der Verwendung des Helferphagen M13K07. Dies bedeutet, dass mehr scFv-Antikörper-Fragmente auf der Oberfläche der Phagen präsentiert werden. Der Hyperphage hat den Wildtyp-Phänotyp für das kleine Hüllprotein pIII, was für eine gute Infektion der *E.coli*-Zellen wichtig ist. Allerdings ist das Gen 3, welches für das Protein pIII kodiert hier durch eine in-frame Deletion funktionslos [83, 84], weshalb bei der Verwendung des Hyperphagen das Phagemid die einzige Quelle einer Gensequenz für das kleine Hüllprotein darstellt. Nachdem die Phagen die Bakterien infiziert haben, werden nur die auf dem Phagemid des Bakteriums kodierten scFv-pIII-Fusionsproteine produziert. Somit wird ausschließlich das scFv-fusionierte pIII-Hüllprotein des Phagemids in die Hülle der Phagen eingebaut. Hierdurch tragen alle neu synthetisierten Hyperphagen an allen fünf pIII-Hüllproteinen ein scFv, wodurch sich die Avidität des Phagen-Antikörpers erhöht [83, 85]. Während der ersten Selektionsrunde besteht der Vorteil der Multivalenz darin, dass positive Binder in der großen Gesamtheit der Klone weniger verloren gehen, da sich durch die polyvalente Darstellung ihre Valenz zum Antigen erhöht [69, 86]. Durch die scheinbar stärkere Affinität des multivalenten Displays, wird aber die Identifizierung besonders starker Bindungen erschwert, weshalb für die weiteren Selektionsrunden auf das monovalente Display zurückgegriffen wird. Der dafür verwendete Helferphage verfügt über das Genom für alle Wildtypproteine, einschließlich pIII. Dadurch präsentiert ein kleiner Teil Phagen auf ihrer Hülle ein Fusionsprotein aus scFv und dem Hüllprotein pIII; die restlichen Hüllproteine entsprechen dann meist dem Wildtyp [87]. Der Großteil der scFv-

präsentierenden Phagen, die dabei hergestellt werden, ist also monovalent. Dies erleichtert das Selektionieren von Bindern mit höherer Affinität [85, 88].

Nach der Selektion verbleibt ein Gemisch von Antikörper-Klonen, die unterschiedliche Bindungseigenschaften aufweisen. Diese Eigenschaften müssen dann individuell getestet werden. Zum Testen der Antigenbindung von mono- oder polyklonalen Phagen-Antikörpern werden zum Beispiel ELISA und die Durchflusszytometrie verwendet [69, 71].

Obwohl die Antikörper bereits zu Beginn über einige wünschenswerte Eigenschaften verfügen, bedürfen sie meist noch einiger Verbesserungen, um ihre Potenz für therapeutische Anwendungen und sensitive Diagnosen zu steigern. In der Regel wird eine Affinitätsreifung durchgeführt, die die pharmakokinetischen Eigenschaften des Antikörpers verbessern kann, was eine höhere Sicherheit, sowie eine Reduzierung von Dosis und unerwünschten Nebenwirkungen bewirken kann [69]. Eine Möglichkeit der Affinitätsreifung ist die ungezielte Mutagenese, bei der durch eine fehleranfällige PCR (so genannte error-prone PCR) Mutationen in die CDRs eingefügt werden. Eine weitere Methode ist die ortsgerichtete Mutagenese, bei der Mutationen an zuvor definierten Punkten eingefügt werden können. Nach dem Einbau der Mutationen schließt sich eine Affinitätsselektion mit definierten Waschbedingungen an [89].

1.3.2 Die Tomlinson-Bibliothek

In dieser Arbeit wurden die etablierten Tomlinson „Phage-Display“ Bibliotheken I + J zur Selektion spezifischer, humaner scFv-Antikörper verwendet. Die Tomlinson-Bibliotheken sind semi-synthetische Phage-Display-Bibliotheken [69]. Für die Herstellung einer semi-synthetischen Phage-Display-Bibliothek können beispielsweise hochfunktionelle CDR3-Sequenzen aus humanen B-Zellen mit der Vielfalt an synthetischen CDR1- und CDR2-Sequenzen kombiniert werden. Durch semi-synthetische Antikörper-Bibliotheken lässt sich die natürliche Vielfalt mit Hilfe von synthetischen Methoden erhöhen, ohne jedoch an Funktionalität einzubüßen. Dazu wird die zentrale V_H -CDR3-Region durch PCR oder oligonukleotid-gerichtete Mutagenese verändert [69]. Die beiden Tomlinson-Bibliotheken I und J tragen jeweils

über 100 Millionen unterschiedliche humane scFv-Antikörperfragmente, die in einem ampicillinresistenten Vektor kodiert sind. Diese Vektoren wurden in TG1 *E.coli*-Zellen transformiert [90]. ScFv sind die inzwischen am häufigsten eingesetzten Antikörper-Fragmente. Sie bestehen nur aus der V_L- und V_H-Region, die mit einem (Gly₄Ser)₃-Linker verbunden werden. Dadurch wird die Stabilität erhöht und die Antigenbindung verbessert, ohne dass es bei der Expression auf der Phagenoberfläche zu einem Affinitätsverlust kommt [71]. Das Grundgerüst („framework“) für die V_H-Region (schwere Kette) besteht aus den Genen V3-23/DP-47 und JH4b, das Grundgerüst für die V_L-Region (leichte Kette) aus den Genen O12/O2/DPK9 und Jκ1. Die von diesen Grundgerüsten kodierte Struktur weist eine hohe thermodynamische Stabilität aus und ist eine der häufigsten im menschlichen Antikörper-Repertoire [90]. Als Alternative stehen auch Antikörper-Bibliotheken aus Fab-Fragmenten zur Verfügung [91].

2 Zielsetzung

Das kleinzellige Bronchialkarzinom (SCLC) metastasiert früh und zeichnet sich durch einen aggressiven Verlauf aus [7, 11, 50]. Etwa zwei Drittel der Patienten befinden sich bei Diagnosestellung bereits in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium [6], indem die 2-Jahres-Überlebensrate weniger als fünf Prozent beträgt [4]. Zielgerichtete Therapien könnten sowohl Metastasen, als auch minimale residuale Tumorzellen bekämpfen und dabei das gesunde Gewebe schonen [15, 17].

Genetische Veränderungen in Tumorzellen führen unter anderem zu einer aberranten Expression von Oberflächenmolekülen [18, 19]. Das Muster an vorhandenen Oberflächenmolekülen ist für jede Krebserkrankung einzigartig, sodass auch bei Patienten mit der gleichen Krebsentität verschiedene Therapeutika erforderlich sind [18, 19], weshalb eine spezifische Therapie gegen diese molekularen Veränderungen erfolgsversprechend zu sein scheint [18, 19]. Als Therapeutika für spezifische Veränderungen an Tumorzellen, werden zur Zeit monoklonale Antikörper oder Tyrosinkinase-Inhibitoren verwendet [20, 22, 39]. Beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom konnten damit bereits vielversprechende Erfolge erzielt werden [39]. Diese konnten jedoch bisher beim SCLC nicht bestätigt werden, sodass der Forschungsbedarf weiterhin als hoch anzusehen ist [39].

Inzwischen wird immer intensiver an der Herstellung und Weiterentwicklung von Antikörpern für die Diagnostik und Therapie geforscht [52]. Insbesondere die Erforschung vollständig humaner oder humanisierter Antikörper, die eine geringere Immunogenität aufweisen, nimmt einen immer größeren Stellenwert ein [57]. Ein effektives Herstellungsverfahren für humane Antikörper ist die in dieser Arbeit verwendete Phage-Display-Technologie. Standardverfahren für das Phage-Display sind Selektionen auf Zelllinien oder aufgereinigten Antigenen. Bei diesen Verfahren liegt das Tumorantigen jedoch nicht in seiner natürlichen Umgebung vor [92, 93]. Das Ziel dieser Arbeit ist es daher die Antikörper auf komplexen Tumorantigenstrukturen zu selektionieren. Dazu sollen die Selektionen direkt auf Patienten-Routinematerial, welches in Form von FFPE-Gewebe konserviert wird, durchgeführt werden. Das FFPE-Tumorgewebe dient dabei als Zielantigen. Ein Nachteil bei der Verwendung von FFPE-

Gewebe ist, dass die Antigene während der Fixation möglicherweise unzugänglich gemacht werden. Diesem Problem soll in dieser Arbeit durch die Verwendung verschiedener Antigendemaskierungsverfahren entgegengewirkt werden. Zusätzlich soll vor den Selektionen eine Depletion auf gesundem Lungengewebe durchgeführt werden, um zu verhindern, dass Antikörper gegen physiologisch vorhandene Oberflächenmarker selektioniert werden.

Durch die Verwendung dieses FFPE-Materials besteht also die Möglichkeit, Antikörper zu generieren, die Antigene auch in ihrer natürlichen Umgebung erkennen und spezifisch auf den individuellen Patienten zugeschnitten sind. Somit wäre für auf diese Weise gewonnene Antikörper sowohl eine diagnostische, als auch eine therapeutische Verwendung denkbar.

3 Material

Geschützte Markenzeichen wurden in dieser Arbeit nicht als solche gekennzeichnet. Das Fehlen der Kennzeichnung bedeutet daher nicht, dass der Produktname frei von Rechten Dritter ist.

3.1 Geräte und Software

Im Folgenden sind nur analytische und präparative Geräte aufgelistet, bei denen es sich nicht um Standardgerätschaften handelt und deren Austausch einen relevanten Einfluss auf die Ergebnisse hat oder haben könnte.

<u>Gerät/Zubehör</u>	<u>Hersteller/Anbieter</u>
Autoklav	Tuttnauer Systec 2540 EL, Systec GmbH Labor-Systemtechnik (<i>Wettenberg</i>)
Blotkammer	XCell SureLock Mini-Cell Electrophoresis System, Life Technologies (<i>Carlsbad/USA</i>)
Durchflusszytometer Software	Guava easyCyte 5HT, Merck Millipore Headquarters (<i>Billerica/USA</i>) InCyte Vers. 2.7
Elektrophoresekammer	Mini-PROTEAN Tetra Cell, Bio-Rad Technologies (<i>Hercules/USA</i>)
Generator	E443 2 Microcomputer Electrophoresis Power Supplies, Consort (<i>Turnhout/Belgien</i>) Standard Power Pack P25, Biometra (<i>Göttingen</i>)
Inkubationsschüttler	Schüttler KS15 mit Inkubationshaube TH 15, Edmund Bühler GmbH (<i>Hechingen</i>) KS 4000 ic control, IKA-Werke GmbH & Co. KG (<i>Staufen</i>)
Ionenaustauscher	Seradest SD 2000 Vario, Seral Erich Alhäuser GmbH (<i>Ransbach-Baumbach</i>)
Mikroplatten Washer	Hydroflex ELISA, Tecan Austria GmbH (<i>Grödig/Österreich</i>)
Mikrotom	Jung SM2000R, Leica Microsystems (<i>Newcastle/UK</i>)
Mikrovolumen- Spektralphotometer Software	NanoDrop ND-1000, Thermo Scientific (<i>Waltham/USA</i>) NanoDrop 3.0.0

Schüttler	Unimax 1010 - rotierender Plattformschüttler, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (<i>Schwabach</i>) Vortex Genie 2 TM , Bender & Hobein AG (<i>Zürich/Schweiz</i>)
Sequenzierautomat Software	3730xl DNA Analyzer, Hitachi (<i>Chiyoda, Japan</i>) Sequencing Analysis 5.3.1
Sonifiziergerät	Branson Digital Cell Disruptor (<i>Danbury/USA</i>)
Spektralphotometer für 96-„well“ Mikrotiterplatten Software	Sunrise-Basic, Tecan Austrian GmbH (<i>Grödig/Österreich</i>) XFluor
Ultrazentrifuge	Sorvall Ultra Pro 80, Thermo Scientific (<i>Waltham/USA</i>)
UV-Cleaner Box	DNA/RNA UV-Cleaner UVT-B-AR, Biosan (<i>Riga/Lettland</i>)
Waagen	KERN 410 (Feinwaage), A&D Company, Limited (<i>Tokio/Japan</i>) PM480 DeltaRange, Mettler-Toledo GmbH (<i>Gießen</i>)
Wasseraufbereitungssystem	Direct-Q 3, Merck Millipore Headquarters (<i>Billerica/USA</i>)
Zelldichtemesser	Ultrospec 10, American Biosciences (<i>Blauvelt/USA</i>)
Zentrifugen	Centrifuge 5415 R, Eppendorf AG (<i>Hamburg</i>) Sigma 3K30, Sigma Laborzentrifugen GmbH (<i>Osterode am Harz</i>) Rotanta/TRC, Hettich GmbH & Co.KG (<i>Tuttlingen</i>)

Weitere Software:

<u>Verwendungszweck</u>	<u>Bezeichnung</u>
Grafikverarbeitung	Dia 0.97.2, Open-Source-Tool
Primerdesign	DNASTAR Lasergene 10
Statistiksoftware	GraphPad Prism 6
Textverarbeitung, statistische Auswertung, Grafikverarbeitung	Office 2010, Microsoft Corp., Redmond, WA, USA

3.2 Puffer, Lösungen, Medien und Agarplatten

Für die Kultivierung von Bakterien und eukaryontischen Zellen wurden die aufgelisteten Medien und Zusätze hergestellt und vor ihrem Einsatz autoklaviert. Das Portionieren erfolgte stets unter Einhaltung der allgemeinen mikrobiologischen Arbeitstechniken.

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
Bacto Agar	Becton, Dickinson and Company (<i>Sparks/USA</i>)
Difco 2xYT (Hefeextrakt-Trypton-Nährboden)	Becton, Dickinson and Company (<i>Sparks/USA</i>)
RPMI-Medium	Gibco by Life Technologies (<i>Carlsbad/USA</i>)
SOC Outgrowth Medium	New England BioLabs Inc. (<i>Ipswich/USA</i>)
Waymouth's MB	Gibco by Life Technologies (<i>Carlsbad/USA</i>)

Weitere verwendete Puffer und Lösungen:

<u>Bezeichnung</u>	<u>Zusammensetzung / Hersteller</u>
10x Puffer (für PCR)	Applied Biosystems by Life Technologies (<i>Carlsbad/USA</i>)
Antarctic Phosphatase 10x Puffer	New England BioLabs Inc. (<i>Ipswich/USA</i>)
BigDye-Puffer und BigDye-Mix	Applied Biosystems by Life Technologies (<i>Carlsbad/USA</i>)
Blotpuffer	0,2 L Methanol 0,7 L ddH ₂ O 0,1 L 10x Towbin (144 g Glycin, 250 mg SDS, 30,29 g Tris)
Citrat-Puffer	0,1 L Citrat (Leica biosystems Novocastra Epitope Retrieval Solutions ph 6) 0,9 L ddH ₂ O
dNTP's	Applied Biosystems by Life Technologies (<i>Carlsbad/USA</i>)
EDTA-Puffer	0,1 L EDTA (Leica biosystems Novocastra Epitope Retrieval Solutions ph 8) 0,9 L ddH ₂ O
Einfriermedium für Bakterien	2xYT-Medium mit 15 % Glycerol
Fötale Kälberserum	FBS, Gibco by Life Technologies

Material

	<i>(Carlsbad/USA)</i>
Homogenisierungspuffer	25 mM Tris-HCl (pH 7,4) 0,32 M Saccharose 1 Tablette Complete Protease Inhibitor Cocktail auf 50 ml, Roche (<i>Basel/Schweiz</i>)
Ladepuffer 6x	Thermo Scientific (<i>Waltham/USA</i>)
LDS Sample Buffer (4x)	NuPage invitrogen (<i>Carlsbad/USA</i>)
MES SDS Running Buffer (20x)	Novex by Life Technologies (<i>Carlsbad/USA</i>)
MPBS 2 % Blockierungspuffer	1x PBS 2 % Magermilchpulver (Carl Roth GmbH & Co. KG, <i>Karlsruhe</i>)
MPBS 4 % Blockierungspuffer	1x PBS 4 % Magermilchpulver (Carl Roth GmbH & Co. KG, <i>Karlsruhe</i>)
NEBuffer 4	New England BioLabs Inc. (<i>Ipswich/USA</i>)
Neutralisierungspuffer	1 M Tris-HCl pH 7,5
PBS 10x („phosphate-buffered saline“)	1,37 M NaCl 27 mM KCl 0,1 M Na ₂ HPO ₄ 17,6 mM KH ₂ PO ₄ 1 L ddH ₂ O
PBS 1x	0,1 L 10x PBS 0,9 L ddH ₂ O pH 7,4
PBST	1x PBS 0,05 % Polysorbat 20 (Tween 20)
PEG/NaCl	20 % Polyethylenglycol 6000 2,5 M NaCl
Puffer für Durchflusszytometer	1x PBS 0,2 % BSA 0,1 % Natriumazid
Recovery Cell Culture Freezing Medium	Gibco by Life Technologies (<i>Carlsbad/USA</i>)
Roti-Block, 10x Konzentrat	Carl Roth (<i>Karlsruhe</i>)
TAE-Puffer	242 g Tris 57,1 ml Eisessig 0,5 M EDTA (pH 8,0) ad 1 L ddH ₂ O
TEA-Puffer	0,1 M pH 12,2 Sigma-Aldrich Chemie GmbH (<i>Steinheim</i>)
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl

	1 mM EDTA pH 8
Tris-HCl Resuspendierungspuffer	50 mM Tris-HCl pH 7,4
Tris-Puffer-Stammlösung (pH 7,4-7,6)	Tris Base 18 g Tris HCl 137 g NaCl 175,6 g mit dest. H ₂ O auf 1 L auffüllen (für die Gebrauchslösung mit dest. H ₂ O 1:20 verdünnt)

3.3 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

In dieser Arbeit verwendete, allgemeine Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Sigma-Aldrich Chemie GmbH (*Steinheim*), Carl Roth GmbH & Co. KG (*Karlsruhe*), SAV LP GmbH (*Flintsbach am Inn*), Promega Corporation (*Madison, USA*), medite GmbH (*Burgdorf*), Thermo Scientific (*Waltham/USA*)

Bei den verwendeten Verbrauchsmaterialien und Plastikwaren handelt es sich entweder um steril verpackte Einmalartikel oder sie wurden vor ihrer Benutzung autoklaviert. Sie wurden von folgenden Herstellern bezogen:

Dako Cytomation (*Glostrup/Dänemark*), Thermo Scientific Nunc A/S (*Roskilde/Dänemark*), Biozym Scientific GmbH (*Hessisch Oldendorf*), greiner bio-one (*Frickenhausen*), R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, (*Emmendingen*)

3.4 Antibiotika

Zur Herstellung einer Stammlösung wurden die Antibiotika in dest. H₂O gelöst und durch einen Filter der Porengröße 0,22 µm sterilfiltriert.

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
Ampicillin Natriumsalz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (<i>Steinheim</i>)
Kanamycin Sulfate Powder	Life Technologies (<i>Carlsbad/USA</i>)

Penicillin-Streptomycin	Gibco by Life Technologies (<i>Carlsbad/USA</i>)
-------------------------	--

3.5 Bakterienstämme

Für Klonierungs- und Expressionsarbeiten lagen die folgenden *E.coli* Bakterienstämme kryokonserviert vor.

<u>Bezeichnung</u>	<u>Anwendung</u>	<u>Genotyp</u>
<i>E.coli</i> K12 ER2925 New England BioLabs Inc. (<i>Ipswich/USA</i>)	Klonierung	<i>ara-14 leuB6 fhuA31 lacY1 tsx78 glnV44 galK2 galT22 mcrA dcm-6 hisG4 rfbD1 R(zgb210::Tn10)TetS endA1 rpsL136 dam13::Tn9 xylA-5 mtl-1 thi-1 mcrB1 hsdR2</i>
XL1-Blue Competent Cells, Agilent Technologies (<i>Waldbronn</i>)	Klonierung	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]</i>
Strain TG1, Zymo Research (<i>Irvine/USA</i>)	Produktion von scFv- präsentierenden Phagen	<i>' t aD36 lacI^f Δ(lacZ) M15 proA⁺B⁺] glnV (supE) thi-1 Δ(mc - hsdSM)5 (r_K⁻ m_K⁻ McrB⁻) thi Δ(lac- proAB)</i>

3.6 Zelllinien und Gewebe

Die mit Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebe entstammen dem Archiv des Instituts für Pathologie in Gießen. Das Patientenmaterial wurde nach Zustimmung der Ethik-Kommission der Justus-Liebig Universität Gießen verwendet (Referenznummer: 68/13).

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Zelllinien nach Zulieferdaten kultiviert.

<u>Bezeichnung</u>	<u>Beschreibung</u>
HEK-293T-Zelllinie	Zur Verfügung gestellt von der „Arbeitsgruppe Zelluläre Tumorummuntherapie“ des Universitätsklinikums Münster
PBMC-Zellmaterial	Aus eigener Herstellung des Instituts für Pathologie, Gießen

SCLC-Zelllinien DMS 273 NCI-H69 NCI-H82	Zur Verfügung gestellt vom Max Planck Institut für Herz- und Lungenforschung, Bad Nauheim
--	---

3.7 Antikörpergenbibliothek und Helferphagen

In dieser Arbeit wurden die Einzelketten-Antikörperbibliotheken „Human Single Fold scFv Libraries I + J“ (Tomlinson I + J) verwendet. Die Bibliotheken wurden ursprünglich vom „Medical Research Council“ (*Cambridge/UK*) bezogen und lagen zu Beginn der Arbeit kryokonserviert vor.

<u>Bezeichnung des Phagen</u>	<u>Hersteller</u>
Helferphage M13KO7	New England BioLabs Inc. (<i>Ipswich/USA</i>)
Hyperphage M13K07ΔpIII	PROGEN Biotechnik (<i>Heidelberg</i>)

In einigen Versuchen wurde zusätzlich ein Ki-4-Phage aus eigener Herstellung der Arbeitsgruppe als Positiv-Kontrolle verwendet.

3.8 Vektoren, Primer und Oligonukleotide

Die Tomlinson-Antikörper-Bibliothek wurde im pIT2-Vektor konstruiert. Der Vektor pMS2 stammt aus eigener Herstellung der Arbeitsgruppe, basierend auf dem Vektor pSecTag2/HygroB des Herstellers Invitrogen by Life Technologies (*Carlsbad/USA*).

Für die ortsgerichtete Mutagenese mussten auf Grund der unterschiedlichen Sequenzen Primer-Paare für jeden selektionierten Klon individuell entworfen werden. Das Design der Primer wurde mit der DNASTAR Lasergene 10 Software durchgeführt. Die Primer für die Mutagenese, sowie die Primer pIT2 und pMS2 wurden dann von MWG Eurofins Genomics (*Ebersberg*) bezogen.

<u>Bezeichnung</u>	<u>Sequenz 5' - 3'</u>
pIT2 3' (≅ pHEN)	CTA TGC GGC CCC ATT CA
pIT2 5' (≅ LMB3)	CAG GAA ACA GCT ATG AC
pMS2 3'	GTA CTC ACC CCA ACA GCT GG
pMS2 5'	CCA AGC TGG CTA GCC ACC ATG

Eine Auflistung der Mutagenese-Primer findet sich im Anhang (siehe 11.1, S. 107).

3.9 Enzyme und Reaktionskits

In dieser Arbeit wurden folgende Reaktionskits nach Herstellerangaben verwendet:

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Verwendung</u>
DyeEx 2.0 Spin Kit	Qiagen GmbH (<i>Hilden</i>)	Aufreinigung von Sequenzierprodukten
FuGene HD Transfection Reagent	Promega Corporation (<i>Madison, USA</i>)	Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen mittels Lipofektion
JetQuick DNA Purification Kits	Genomed GmbH (<i>Löhne</i>)	Isolation und Reinigung von DNA in der präparativen Agarose-Gelelektrophorese
QIAGEN Plasmid Mini Kit	Qiagen GmbH (<i>Hilden</i>)	Plasmid Mini Präparation
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH (<i>Hilden</i>)	Aufreinigung von PCR-Produkten

Die folgenden Enzyme zur DNA Amplifikation, Restriktion, Ligation und Dephosphorylierung wurden - soweit nicht anders angegeben - nach Herstellerangaben eingesetzt:

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
Antarctic Phosphatase	New England BioLabs Inc. (<i>Ipswich/USA</i>)
DpnI (10.000 units/ml)	Thermo Scientific (<i>Waltham/USA</i>)
NotI-HF (20.000 units/ml)	New England BioLabs Inc. (<i>Ipswich/USA</i>)
Pfu DNA Polymerase	Thermo Scientific (<i>Waltham/USA</i>)
SfiI (20.000 units/ml)	New England BioLabs Inc. (<i>Ipswich/USA</i>)
T ₄ DNA Ligase	New England BioLabs Inc. (<i>Ipswich/USA</i>)
Taq Polymerase	Roche (<i>Basel/Schweiz</i>)
XhoI (20.000 units/ml)	New England BioLabs Inc. (<i>Ipswich/USA</i>)

Zur Vorbehandlung der Gewebeschnitte wurde außerdem das Enzym E1 aus dem Bond Enzyme Pretreatment Kit, Leica Biosystems (*Wetzlar*) verwendet.

3.10 Antikörper

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
Anti-M13 Monoclonal Antibody	GE Healthcare (<i>Chalfont St Giles, UK</i>)
FITC Goat Anti-Mouse IgG/IgM	BD Biosciences (<i>Franklin Lakes, USA</i>)
HRP/Anti-M13 Monoclonal Conjugate	GE Healthcare (<i>Chalfont St Giles, UK</i>)
Rabbit-anti-mouse HRP	Dako Deutschland GmbH (<i>Hamburg</i>)

3.11 Molekulargewichtsmarker

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder	Thermo Scientific (<i>Waltham/USA</i>)
MagicMark XP Western Protein Standard	Invitrogen (<i>Carlsbad/USA</i>)
Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder	Thermo Scientific (<i>Waltham/USA</i>)

3.12 Material für den Western Blot

Für den Western Blot wurden zusätzlich zu den oben genannten noch folgende Materialien verwendet:

<u>Material</u>	<u>Hersteller</u>
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare (<i>Chalfont St Giles, UK</i>)
Hypercassette	GE Healthcare (<i>Chalfont St Giles, UK</i>)
Immobilon Blotting Filter Paper	Merck Millipore Headquarters (<i>Billerica/USA</i>)
Immobilon-P Transfer Membrane	Merck Millipore Headquarters (<i>Billerica/USA</i>)
Kodak Readymatic Dental Entwickler	Carestream Health Deutschland GmbH (<i>Stuttgart</i>)
Kodak Readymatic Dental Fixierer	Carestream Health Deutschland GmbH

Material

	<i>(Stuttgart)</i>
ECL Prime Lösung A und B	Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent, GE Healthcare (<i>Chalfont St Giles, UK</i>)
NuPAGE Novex 4-12 % Bis-Tris Gel	Novex by life technologies (<i>Carlsbad/USA</i>)
ProtoBlue Safe Colloidal Coomassie G-250 stain	National diagnostics (<i>Atlanta/USA</i>)

4 Methoden

4.1 Zellbiologische Methoden

4.1.1 Kultivierung der benötigten eukaryontischen Zelllinien

Die Kultivierung der SCLC-Suspensionszelllinien NCI-H82 und NCI-H69 erfolgte in Rosewell Park Memorial Institute Medium (RPMI) 1640 mit Zugabe von 10 % hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS) und 1 % Pen/Strep. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ in einem Brutschrank kultiviert. Die Zellen wurden alle zwei bis drei Tage im Verhältnis 1:2 bis 1:3 (Zellsuspension : Medium) gesplittet, sodass eine Konzentration von $0,1-0,8 \times 10^6$ Zellen/ml erhalten werden konnte. Die Zellzahl wurde mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Zur Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen wurde eine Trypanblau-Färbung durchgeführt.

Die dritte SCLC-Zelllinie (DMS 273) wurde in Waymouth's MB 752/1 Medium mit Zugabe von 10 % hitzeinaktiviertem FCS und 1 % Pen/Strep bei gleicher Temperatur und CO₂-Begasung kultiviert.

Die verwendeten HEK-Zellen der Linie HEK293T entstammten embryonalen Nierenzellen. Das besondere an der HEK-Zelllinie 293T ist, dass diese Zellen zusätzlich das „simian virus 40 large T Antigen“ (SV40TA_g) tragen. Dieses Protein ist ein starkes Onkogen. Es umgeht die Zell-Zyklus-Kontrollpunkte wie z. B. p53-Tumorsuppressoren und führt so zu einer unbegrenzten DNA-Replikation und Proteinproduktion innerhalb der Zelle. Die Funktion dieses Antigens wird auch in einer Übersichtsarbeit von Ali und DeCaprio beschrieben [94, 95]. Die HEK-Zellen wurden ebenfalls in RPMI (mit Zugabe von 10 % FCS und 1 % Pen/Strep) bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Das Nährmedium wurde hier alle zwei bis drei Tage im Verhältnis 1:5 bis 1:6 erneuert. Die HEK-Zellen wachsen wie die DMS 273-Zellen adhärent. Zur Gewinnung von PBMC-Zellen wurde Heparin-Blut eines gesunden Spenders mit gleicher Menge RPMI (ohne Zusätze) verdünnt. Diese Suspension wurde dann einer Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation unterzogen: In ein 15 ml-Röhrchen wurden 3 ml Ficoll gegeben, die dann vorsichtig mit 5 ml Blut-RPMI-Gemisch überschichtet wurden. Im Anschluss wurde 30 min bei Raumtemperatur und 800 g ohne Bremse zentrifugiert. Während des Zentrifugierens sinken Erythrozyten, Granulozyten und tote

Zellen ab, die PBMC-Zellen reichern sich jedoch in einer ringförmigen Schicht zwischen Ficoll und Plasma an. Der PBMC-Ring wurde danach abpipettiert und in ein neues Röhrchen überführt. Diesem wurden zum Waschen 10 ml RPMI (ohne Zusätze) zugefügt. Diese Suspension wurde dann 5 min bei 600 g zentrifugiert. Die Zellen wurden dann erneut in 10 ml RPMI aufgenommen und zentrifugiert. Durch diese Waschschrte wurde die Suspension von Zellfragmenten und Thrombozyten gereinigt. Nach dem Waschen wurden die Zellen in 10 ml RPMI mit Zusatz von 10 % FCS und 1 % Pen/Strep aufgenommen. Nach einer Färbung mit Trypanblau konnten die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer gezählt werden. Zum Einfrieren wurden $5-10 \times 10^6$ Zellen abgenommen und 5 min bei 600 g abzentrifugiert. Die Zellen wurden dann in 1 ml Einfriermedium aufgenommen und in ein Kryoröhrchen überführt. Die Lagerung erfolgte bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Zum Auftauen wurden die PBMC's aus einem Kryoröhrchen in 5 ml RPMI gegeben und im Anschluss 5 min bei 600 g zentrifugiert. Das Zellpellet konnte dann in 3 ml RPMI mit 10 % FCS und 1 % Pen/Strep aufgenommen und in eine kleine Kulturflasche gegeben werden. Die PBMC's wurden im Brutschrank stehend inkubiert.

4.1.2 Herstellung von Membranfragmenten

Zur Herstellung von Membranfragmenten wurden zunächst 1×10^7 Zellen, der gewünschten Zelllinie 5 min bei 600 g und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ abzentrifugiert. Das Pellet wurde dann in 10 ml PBS aufgenommen und erneut zentrifugiert. Dieser Waschschrte wurde anschließend weitere 2 Mal durchgeführt, bevor das Pellet in 6 ml eiskaltem Homogenisierungspuffer aufgenommen und auf Eis gestellt wurde. Die Suspension wurde 20 Mal für 1 sec sonifiziert (dazwischen 0,5 sec Pause, Intensität 30 %) und im Anschluss daran für 12 min bei 1.000 g und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Der Überstand wurde daran anschließend in einer Ultrazentrifuge 20 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 100.000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml Resuspensionpuffer aufgenommen und erneut in der Ultrazentrifuge abzentrifugiert. Nachdem das Pellet in 1,2 ml PBS aufgenommen wurde, konnte es bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden.

4.2 Phage-Display

4.2.1 Phagerescue aus den Tomlinson Bibliotheken I und J

Anzucht:

Von den kryokonservierten Tomlinson Phagen Bibliotheken I und J wurde jeweils ein etwa stecknadelkopfgroßes Stückchen der „phagemid“-tragenden *E.coli* TG1F+ Kulturen abgekratzt und in je 5 ml 2xTY-Medium (100 µg/ml Amp, 1 % Gluc) gegeben. Für die weiteren Selektionsrunden wurden die kryokonservierten Produkte der vorherigen Selektionsrunde zum Abkratzen verwendet. Das die Kultur enthaltende Medium wurde anschließend über Nacht bei 37 °C und 250 rpm im Inkubationsschüttler vorkultiviert. Dabei wurde der Deckel des Röhrchens nur soweit zugekehrt, dass ein Luftaustausch noch möglich war.

Am folgenden Tag wurden die scFv-präsentierenden Phagen produziert, indem die „phagemid“-tragenden Bakterien mit Phagen infiziert wurden. Dazu wurden pro Bibliothek 10 ml frisches 2xTY-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 1 % Glucose angesetzt. Dieses Medium wurde dann mit jeweils 200 µl der Vorkulturen angeimpft und bei 37 °C und 250 rpm im Inkubationsschüttler inkubiert, bis eine OD_{600nm} von 0,4-0,5 erreicht wurde, sodass sich die Bakterien für die darauf folgende Infektion mit dem Hyper- bzw. Helferphagen in der logarithmischen Wachstumsphase befanden. Nur in dieser Wachstumsphase können die Bakterien den F-Pilus ausbilden, über den die Infektion mit den Phagen erfolgt.

Infektion mit dem Hyperphagen/Helferphagen:

Von beiden Kulturen wurden jeweils 5 ml abgenommen und mit 10 µl M13KO7 Hyperphage (1×10^{12} Phagen/ml) für die erste Selektionsrunde bzw. 100 µl Helferphage (1×10^{11} Phagen/ml) für die weiteren Selektionsrunden infiziert. Durch die oben genannten Volumina lässt sich ein Infektionsverhältnis („multiplicity of infection“ = MOI) von einem Bakterium zu 20 Phagen erreichen (MOI=20). Das Zugeben der Hyper- bzw. Helferphagen im Überschuss sollte zur weiteren Erhöhung der Infektionseffizienz beitragen. Die infizierte Kultur wurde nun für 30 min bei 37 °C stationär inkubiert. Daran anschließend erfolgte eine weitere Inkubation von 30 min bei 37 °C jedoch bei 250 rpm. Das pIII Hüllprotein des Phagen bindet während der

Inkubation an den F-Pilus des Bakteriums. Nach der Inkubation wurden jeweils 50 μ l der infizierten Bibliothek auf einer 2xTY-Platte, die 100 μ g/ml Ampicillin und 50 μ g/ml Kanamycin enthält, ausplattiert. Da der Phagemid-Vektor eine Ampicillin-Resistenz enthält, der Phage jedoch gegen Kanamycin resistent ist, wachsen auf den Platten nur Bakterien, die das Phagemid enthalten und vom Phagen infiziert wurden. Bei erfolgreicher Infektion sollte diese Platte am Folgetag also dicht bewachsen sein. Die restlichen 4,95 ml der Bibliothek wurden bei 4 °C und 4.500 g für 5 Minuten zentrifugiert und der Phagen-enthaltende Überstand verworfen. Daraufhin wurde das infizierte Bakterienpellet in 25 ml frischem 2xTY-Medium (100 μ g/ml Amp, 50 μ g/ml Kan und 0,25 mM IPTG) resuspendiert und anschließend über Nacht bei 30 °C und 250 rpm inkubiert. Die Zugabe des IPTG als Lactose-Analogon ist nötig, um an den Lactose-Repressor im Bakterium zu binden und so die Transkription der Gene des Lac-Operon anzuschalten. Dadurch wird die Proteinexpression des scFv-pIII Fusionsproteins induziert, welches bei der Herstellung neuer Phagenpartikel als Schwanzprotein dienen soll. Um die Erzeugung von Proteineinschlusskörperchen zu verhindern und eine möglichst hohe Phagenkonzentration zu erhalten, fand dieser Schritt bei einer Temperatur von 30 °C statt.

Sind die Infektionskontrollplatten am Folgetag dicht bewachsen, können die Phagen von den Bakterien getrennt werden. Dazu wurde die Übernachtskultur bei 4.500 g und 4 °C für 30 min zentrifugiert und der Phagen enthaltende Überstand daraufhin in ein neues Röhrchen überführt.

Fällung der Phagen:

Die Phagenpartikel wurden durch Zugabe von 5 ml eiskalter PEG/NaCl-Lösung (20 % PEG 6000, 2,5M NaCl) und einstündiger Inkubation auf Eis gefällt. Währenddessen wurde die Suspension regelmäßig durchmischt. Das Phagen-Präzipitat wurde anschließend 30 min bei 4 °C und 15.000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach kurzem Trocknen wurde das Phagenpellet in 200 μ l PBS resuspendiert und in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Daran anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 4 °C und 13.000 g für zwei Minuten. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und bei 4 °C (bzw. -20 °C für Langzeitaufbewahrung) gelagert.

Bestimmung des Input-Titers:

Die Phagensuspension wurde in PBS auf $1:10^4$, $1:10^6$ und $1:10^8$ verdünnt und mit der vierfachen Menge TG1s versetzt. Die TG1s wurden zuvor in 2xTY-Medium ohne Zusätze bis zu einer OD_{600nm} von 0,4-0,5 inkubiert (37 °C, 250 rpm). Die Röhrchen der Verdünnungsreihe wurden 30 min stationär bei 37 °C inkubiert, danach weitere 30 min bei 37 °C und 250 rpm.

Nach der Inkubation wurden 10 µl jeder Verdünnung auf eine 2xTY_{Amp/Glucose}-Platte (100 µl/ml Amp, 1 % Gluc) ausplattiert. Des Weiteren wurden zur Kontaminationskontrolle der TG1s 50 µl von diesen auf einer 2xTY_{Amp/Kan}-Platte (100 µl/ml Amp, 50 µl/ml Kan) ausplattiert. Diese Platte sollte am nächsten Tag leer sein. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Am Folgetag wurde die Kolonienanzahl auf den Verdünnungsplatten gezählt und der Input-Titer nach folgender Formel berechnet:

$$Titer \left[\frac{cfu}{ml} \right] = \frac{Kolonienanzahl \times 5}{Verdünnungsstufe \times Volumen}$$

4.2.2 Depletion und Selektion

Die Selektion der spezifisch bindenden Phagen erfolgt in drei Runden. In der ersten Selektionsrunde war ein multivalentes Display von Vorteil, um aus der Vielfalt von Antikörpern innerhalb der Bibliotheken einzelne Binder zu erfassen. Diese Multivalenz ließ sich durch den Einsatz des Hyperphagen erreichen. Ab der zweiten Selektionsrunde wurde das monovalente Display mithilfe des Helferphagen verwendet, um Binder mit höherer Affinität zu selektionieren [88].

Die bei diesem Schritt verwendeten FFPE-Schnitte wurden zuvor wie folgt hergestellt: Die Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Biopsate wurden auf einem Eisblock herunter gekühlt und dann mit einem Mikrotom 2 µm dünne Schnitte erstellt, welche auf Superfrost-Objektträger gezogen wurden. Im Anschluss wurden die Schnitte für 30 min bei 60 °C im Wärmeschrank getrocknet.

Zur Durchführung von Depletion und Selektion wurden pro Bibliothek 100 µl Phagensuspension mit gleicher Menge 4 % MPBS für 2 h auf einem Rotator geblockt.

Das Milchpulver soll während des Blockens freie Bindungsstellen absättigen und so unspezifische Bindungen verhindern.

Um eine Kreuzreaktivität gegen unspezifische Oberflächenmarker zu verhindern wurde eine Depletion auf tumorfreiem Lungengewebe durchgeführt. Dazu wurden pro Bibliothek je 4 Objektträger (OT) verwendet. Die Objektträger wurden dazu nach folgendem Schema entparaffiniert:

1. OT für 10 min in ein Xylol-Bad stellen
2. Dann 3x in ein 100 % Ethanol-Bad eintauchen
3. Erneut 3x in frisches Ethanol-Bad eintauchen
4. Schritt 2 und 3 mit 96 % Ethanol-Bad wiederholen
5. OT in 70 % Ethanol-Bad eintauchen
6. OT in aqua dest. spülen

Die OT wurden um das Gewebe herum vorsichtig abgetrocknet und das Gewebe mit einem Fettstift umkreist, damit die Phagensuspension präzise auf das Gewebe pipettiert werden konnte. Zur Durchführung der Depletion wurden nun je 50 µl der geblockten Phagen auf jeden OT gegeben und 1 h inkubiert. In dieser Zeit wurden pro Bibliothek 4 OT mit SCLC-Gewebe nach oben genanntem Schema entparaffiniert. Diese OT wurden jedoch zusätzlich vorbehandelt, um mögliche Antigene zu demaskieren. Dabei fanden die Methoden „heat induced epitope retrieval“ (HIER) bzw. „proteolytic induced epitope retrieval“ (PIER) Verwendung.

Ein OT pro Bibliothek erhielt keine Vorbehandlung und blieb im Tris-Puffer stehen. Jeweils ein OT wurde enzymatisch vorbehandelt. 150 µl des Enzyms E1 (Bond Enzyme Pretreatment Kit, Leica Biosystems) wurden aufgetragen und bei 37 °C für 10 min im Wärmeschrank inkubiert. Ein weiterer OT wurde mit Citrat- bzw. EDTA-Puffer vorbehandelt. Dazu wurden die Schnitte in ein Kunststoffgefäß mit den jeweiligen Lösungen gestellt und für 15 min bei 180 W in der Mikrowelle aufgeköcht. Nach dem Abkühlen wurden diese Schnitte zusammen mit den Schnitten ohne und mit enzymatischer Vorbehandlung 3 Mal in Tris-Puffer gespült und blieben bis zu ihrer Verwendung im Puffer stehen. Auch bei diesen OT wurde das Gewebe vorsichtig mit einem Fettstift umkreist.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die depletierten Phagen mithilfe einer Pipette vorsichtig vom Depletions-Gewebe abgesaugt und auf das Selektions-Gewebe gegeben. Nach 1 h Inkubationszeit wurden die OT nach folgendem Protokoll gewaschen:

1. Selektionsrunde	2. Selektionsrunde	3. Selektionsrunde
<ul style="list-style-type: none"> • 3x kurz in PBS tauchen • 2x für je 5 min in PBS auf einem Schüttler bei RT • 3x kurz in PBS tauchen • 2x für je 5 min in PBS auf einem Schüttler bei RT 	<ul style="list-style-type: none"> • 1x kurz in PBST tauchen • 4x für je 5 min in PBST auf einem Schüttler bei RT • 1x kurz in PBST tauchen • 4x für je 5 min in PBST auf einem Schüttler bei RT 	<ul style="list-style-type: none"> • 10x kurz in PBST tauchen • 5x für je 5 min in PBST auf einem Schüttler bei RT • 10x kurz in PBST tauchen • 5x für je 5 min in PBST auf einem Schüttler bei RT

Zur Elution der spezifisch gebundenen Phagen wurden 50 µl TEA-Puffer (pH 12,2) für 10 min auf jedes Gewebe gegeben. Anschließend wurden die eluierten Phagen von allen vier OT einer Bibliothek zusammen in ein Reaktionsgefäß gegeben und mit gleicher Menge (\cong 200 µl) Tris HCl versetzt und auf Eis gestellt. Aus dieser Suspension konnte nun, analog zur Bestimmung des Input-Titers, eine Verdünnungsreihe zur Bestimmung des Output-Titers ausplattiert werden.

Auf jedes Selektionsgewebe wurden 50 µl TG1s gegeben. Die TG1s wurden zuvor in 2xTY-Medium ohne Zusätze bis zu einer OD_{600nm} von 0,4-0,5 inkubiert (37 °C, 250 rpm). Danach wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert. Parallel dazu wurden die 400 µl Phageneluat zu weiteren 15 ml der TG1s gegeben und ebenfalls für 30 min bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurden die TG1s von den OT abgesaugt und zu den anderen TG1s gegeben. Diese Suspension wurde dann 5 min bei 4.500 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach resuspendieren in 200 µl 2xTY Medium wurden die Bakterien auf einer großen 2xTY_{Amp/Gluc}-Agarplatte (100 µl/ml Amp, 1 % Gluc) pro Bibliothek ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Am darauffolgenden Tag wurden die Kolonien dieser Platten mit 1,5 ml 2xTY_{Glycerol/Amp/Gluc}-Medium (15 % Glycerol, 100 µg/ml Amp, 1 % Gluc) abgeschabt und in ein Kryoröhrchen pipettiert, welches zunächst bei -20 °C eingefroren und dann bei -80 °C gelagert wurde.

Berechnung des Output-Titers:

Am Folgetag wurde die Kolonienanzahl auf den Verdünnungsplatten gezählt und der Titer nach folgender Formel berechnet:

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

4.2.3 Analyse der Anreicherung spezifischer scFv-Phagen im Durchflusszytometer

Um die Anreicherung SCLC-spezifischer Phagen-Antikörper zu überprüfen, wurde die Bindeaktivität der gewonnenen Selektionsfraktionen auf der SCLC-Zelllinie NCI-H82 getestet. Dazu wurden zunächst Phagen der einzelnen Selektionsrunden und der Original-Bibliotheken hergestellt (s. S. 40). Nach der Herstellung wurde von allen Phagen-Suspensionen der Input-Titer bestimmt. Um nun vergleichbare Ergebnisse bei der Messung der Bindungsaktivität zu erhalten, wurden die Phagentiter einheitlich eingestellt. Hierbei wurde sich an dem geringsten Input-Titer orientiert und die Konzentration der weiteren Suspensionen entsprechend in PBS verdünnt. Außerdem wurden $2 \cdot 5 \cdot 10^5$ Zellen abgenommen und 5 min bei 600 g abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml PBS aufgenommen und erneut 5 min bei 600 g abzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in einem 1,5 ml Gefäß in 100 µl 2 % MPBS aufgenommen und eine Stunde bei RT auf einem Rotator geblockt. Parallel dazu wurden 50 µl Phagen jeder Selektionsrunde mit 50 µl 4 % MPBS ebenfalls 60 min geblockt. Anschließend wurden die geblockten Phagen-Antikörper zu den Zellen gegeben, kurz gemischt und eine Stunde bei 4 °C inkubiert. Danach wurde zum Waschen 1 ml PBS (mit 0,2 % BSA und 0,1 % Natriumazid) zugegeben und 5 min bei 800 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen erneut gewaschen und zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl 2 % MPBS aufgenommen. Danach wurde 1 µl des 1:100 in PBS verdünnten mouse anti M13 Antikörpers zugegeben und 30 min bei 4 °C inkubiert, bevor erneut zwei Mal gewaschen und zentrifugiert wurde. Zu dem in 100 µl 2 % MPBS aufgenommenen Pellet wurden 2 µl fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper (goat anti mouse FITC Antikörper) gegeben. Es schlossen sich eine 30-minütige Inkubation bei 4 °C und ein erneutes Waschen und Zentrifugieren an, bevor das Pellet zur längerfristigen Fixation in 500 µl 1 % Paraformaldehydlösung

aufgenommen wurde und im Durchflusszytometer gemessen werden konnte. Durch den fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper konnte die Bindung der Phagen-Antikörper an den NCI-H82 Zellen nachgewiesen und somit die unterschiedliche Bindeaktivität der einzelnen Selektionsrunden verglichen werden.

4.2.4 Herstellung der Masterplatten und monoklonaler ELISA

Um aus dem polyklonalen Phagen-Antikörper-Gemisch einzelne Klone auf ihre Spezifität testen zu können, mussten diese vereinzelt werden. Dazu wurden zunächst gefrorene Bakterien der 3. Selektionsrunde beider Bibliotheken abgekratzt und in 5 ml 2xTY-Medium (100 µg/ml Amp, 1 % Gluc) über Nacht bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Am Folgetag wurden je neun 2xTY_{Amp/Gluc}-Agarplatten (100 µg/ml Amp, 1 % Gluc) gegossen und eine Verdünnungsreihe der Übernachtskultur (10^{-4} , 10^{-6} und 10^{-8}) erstellt. Von jeder Verdünnungsstufe wurden je 10 µl Bakteriensuspension auf drei Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden vier 96-Well-Platten pro Bibliothek mit 250 µl 2xTY-Medium (100 µg/ml Amp, 1 % Gluc) pro Well gefüllt. Von den Agarplatten wurden nun mit autoklavierten Zahnstochern einzelne Klone gepickt und in die Reihen 1-11 der Platten überführt. Diese Masterplatten wurden über Nacht inkubiert. Zur Lagerung bei -80 °C wurde in jedes Well 45 µl 100 % Glycerol pipettiert.

Monoklonaler ELISA:

Zur Überprüfung der spezifischen Bindeaktivität der vereinzelt Klone wurde ein monoklonaler ELISA durchgeführt. In eine 96-Well-Platte wurde pro Well 150 µl 2xTY-Medium (100 µg/ml Amp, 1 % Gluc) gegeben. Zur Infektion dieser Arbeitsplatte wurden mit einem Impfstempel Bakterien der Masterplatte abgekratzt. Nach ca. 2-stündiger Inkubation bei 37 °C und 250 rpm sollten die Bakterien eine OD₆₀₀ von 0,4-0,5 erreicht haben. Dann wurden 30 µl des 1:100 in PBS verdünnten Hyperphagen-Stocks in jedes Well gegeben und für 30 min stationär bei 37 °C und weitere 30 min bei 250 rpm inkubiert. Nach Zentrifugation bei 1.800 g und 4 °C für 10 min wurden die Überstände verworfen und die Pellets in je 200 µl 2xTY-Medium (100 µg/ml Amp, 50 µg/ml Kan, 0,25mM IPTG) resuspendiert. Die Arbeitsplatte wurde daraufhin abgedeckt

bei 30 °C und 250 rpm über Nacht inkubiert. Des Weiteren wurden Membranfragmente auf einer Immuno-Mikrotiterplatte immobilisiert. Dazu wurden die Membranfragmente der zu untersuchenden Zelllinie (in diesem Fall NCI-H82) 1:10 in PBS verdünnt und dann 100 µl in jedes Well gegeben. Diese Platte wurde nun bei 4 °C ebenfalls über Nacht inkubiert. Zusätzlich wurden zwei Wells mit dem Antigen CD30 gecoatet. Diese Wells dienten später als Positivkontrolle.

Am folgenden Tag wurde die Arbeitsplatte bei 1.800 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. 70 µl des Phagenüberstandes wurden gemeinsam mit 70 µl 4 % MPBS in jedes Well einer neuen 96-Well-Platte gegeben und für 2 Stunden bei 250 rpm inkubiert. Die Immuno-Mikrotiterplatte wurde währenddessen 3 Mal mit PBS gewaschen. Danach wurden die antigenbeschichteten Wells mit 200 µl 2 % MPBS gefüllt und ebenfalls 2 Stunden bei 250 rpm inkubiert. Im Anschluss wurde die Immuno-Mikrotiterplatte erneut 3 Mal gewaschen und je 100 µl der geblockten Phagen in die antigenbeschichteten Wells gefüllt. Dabei wurde für die Positivkontrollen der Ki-4-Phage verwendet, der CD30-spezifisch ist [96]. Nach einer weiteren einstündigen Inkubation bei 250 rpm wurde die Platte erneut 3 Mal gewaschen und mit 100 µl M13-Antikörper mit HRP pro Well befüllt. Der Antikörper wurde zuvor 1:5.000 in 2 % MPBS verdünnt. Es folgten eine weitere einstündige Inkubation und ein erneutes 3-maliges Waschen, bevor 100 µl TMB in jedes Well gegeben wurde. Die Platte wurde nun abgedeckt bei 250 rpm geschüttelt. Sobald sich eine deutliche Blaufärbung der Wells zeigte (nach 5 – 7 min), wurde die Reaktion mit 100 µl 2 M Schwefelsäure pro Well abgestoppt und die ELISA-Messung bei 450 nm (Referenzwellenlänge: 690 nm) durchgeführt.

Nach Auswertung des monoklonalen ELISA wurde eine Kompressionsplatte erstellt. Dazu wurden die zwölf stärksten, vier mittelstarke und 2 schwächere Binder aller Masterplatten von Bibliothek J ausgewählt und in eine gemeinsame 96-Well-Platte überführt. Dazu wurden im Vorfeld 200 µl 2xTY-Medium (100 µg/ml Amp, 1 % Gluc) pro Well vorgelegt. Mit dieser Kompressionsplatte wurde der monoklonale ELISA dann zur Bestätigung der Ergebnisse wiederholt. In diesem Falle wurde die Immuno-Mikrotiterplatte zur Kontrolle von unspezifischen Bindungen allerdings zusätzlich zu NCI-H82 auch mit Membranfragmenten (MF) von PBMC's und mit BSA beschichtet

(gecoatet). Die MF wurden auch hier 1:10 verdünnt eingesetzt. Das BSA wurde in einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt.

4.2.5 Plasmid Mini Präparation

Von den Bindern der Kompressionsplatte wurde dann aus den entsprechenden Wells der Masterplatte mithilfe einer Pipettenspitze ein wenig abgekratzt und in je 5 ml 2xTY-Medium (100 µg/ml Amp, 1 % Gluc) gegeben. Die Bakteriensuspension wurde über Nacht bei 37 °C und 250 rpm inkubiert, bevor die Plasmid Mini Präparation nach dem Protokoll des QIAGEN[®] Plasmid Mini Kit durchgeführt wurde. Das getrocknete Plasmid wurde abschließend in 50 µl aqua dest. aufgenommen. Nach Messung des DNA-Gehaltes wurde die Suspension bei -20 °C gelagert.

4.2.6 Nachweis von scFv Sequenzen in den Plasmiden der Einzelklone

Im Folgenden wurde mithilfe eines Restriktionsverdau überprüft, ob alle Plasmide das richtige Insert tragen. Dazu wurde jeweils das Volumen der Plasmid Mini Präparationen verwendet, welches 250 ng DNA entsprach und mit 2,5 µl 10x BSA, 2,5 µl 10x NEBuffer 4, sowie 1 µl des Restriktionsenzym NotI in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß gegeben. Das Volumen wurde mit aqua dest. auf 24 µl aufgefüllt. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37 °C wurde dann jeweils 1 µl des Restriktionsenzym SfiI zugegeben und für eine weitere Stunde bei 50 °C inkubiert. Die Temperaturen entsprachen dabei dem Temperaturoptimum des jeweiligen Enzyms. Nach der Inkubation wurden die Restriktionsprodukte für 20 min auf 65 °C erhitzt, um die Restriktionsenzyme zu inaktivieren und dann auf ein Agarosegel gegeben.

Zum Gießen des Gels wurden 80 ml 1x TAE-Puffer mit 1,5 % Agarose in der Mikrowelle aufgeköcht und dann mit 5 µl einer einprozentigen Ethidiumbromidlösung versetzt. Nach Aushärten des Gels konnte dieses in die Elektrophoresekammer gesetzt werden, die ebenfalls mit TAE-Puffer befüllt wurde. Danach konnten die Taschen mit den Restriktionsprodukten und einem Molekulargewichtsmarker als Standard beladen werden. Um die Restriktionsfragmente nun nach ihrer Größe aufzutrennen, wurde für 40 min eine Spannung von 100 V angelegt. Die DNA-Banden wurden anschließend

unter einem UV-Licht bei einer Wellenlänge von 302 nm visualisiert. Dadurch konnten die Restriktionsfragmentgrößen im Vergleich zum aufgetragenen Standard ermittelt werden.

4.2.7 Sequenzierung und ortsgerichtete Mutagenese

Im Folgenden wurden die Plasmide sequenziert, um die DNA-Sequenz der Antikörper zu erhalten. Hierbei konnte zusätzlich überprüft werden, ob die DNA-Sequenzen Amber Stopp-Codons (TAG) enthalten, welche sich bei der Tomlinson Bibliothek häufig finden lassen. Der bisher verwendete TG1-Bakterienstamm ist in der Lage bei der Translation des Stopp-Codons anstelle einer Termination die Aminosäure Glutamat einzufügen. Diese Eigenschaft haben die später verwendeten Produktionszellen nicht. Daher mussten mögliche Stopp-Codons identifiziert und entfernt werden.

Sequenzierungs-PCR und Aufreinigung der Produkte:

Zur Vervielfältigung der DNA wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Dafür wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

2 µl	5x BigDye Puffer
1 µl	BigDye Mix 3.1
4,5 µl	aqua dest.
1,5 µl	Primer pHEN bzw. LMB3 (100 pmol/µl)
Und 1 µl	des jeweiligen Templates (Plasmid Mini Präparation)

Für jedes zu untersuchende Plasmid wurde dieser Reaktionsansatz zwei Mal vorbereitet, dabei wurde je einmal der 3'-Primer und einmal der 5'-Primer verwendet. Im Thermocycler wurde folgendes Programm eingestellt:

	1 min 96 °C	} 25 Zyklen
Denaturierung:	10 s 96 °C	
Primerhybridisierung:	5 s 50 °C	
Elongation:	75 s 60 °C	
	4 °C	

Sequenzierung:

Die PCR-Produkte wurden im Anschluss für die Sequenzierung aufgereinigt. Die Aufreinigung wurde wie in der Gebrauchsanweisung des DyeEx[®] 2.0 Spin Kit

beschrieben durchgeführt. Die eigentliche Sequenzierung erfolgte nach der Didesoxy-Methode nach Sanger. Hierfür wurden 10 µl der aufgereinigten Proben zusammen mit 10 µl Formamid in eine MicroAmp Optical 96-Well Reaction Platte und anschließend in den Sequenzer gegeben. Mithilfe der Sequenzierung konnten nicht nur die Stopp-Codons ermittelt werden, sondern auch wie viele verschiedene Binder auf der Kompressionsplatte zu finden waren.

Ortsgerichtete Mutagenese:

Um die Stopp-Codons zu entfernen wurde eine Substitution des Amber Stopp-Codon zu Glutamin (TAG zu CAG) mit Hilfe einer ortsgerichteten Mutagenese durchgeführt. Dafür war es zunächst erforderlich spezifische Primer für die zu mutierenden Stellen zu designen. Die Länge der Primer sollte dabei ca. 18 Basen vor und nach der zu mutierenden Stelle betragen und außerdem an den Enden eine Guanin- oder Cytosin-Nukleinbase enthalten. Der 3'-Primer wurde dabei reverse komplementär zum 5'-Primer designed.

Die Primer wurden vor der Mutagenese nach Herstellerangaben mit TE-Puffer verdünnt, sodass die Ausgangskonzentration 100 pmol/µl betrug. Dann wurden alle Primer erneut 1:10 in aqua dest. verdünnt. Anschließend wurde für jedes Plasmid folgender PCR-Ansatz hergestellt:

5 µl	10x Puffer
0,5 µl	dNTP's
1 µl	5'-Primer (für das jeweilige Template)
1 µl	3'-Primer (für das jeweilige Template)
1 µl	Pfu Pol.
50 ng	Template (Plasmid Mini Präparation)
Ad 50 µl	Aqua dest.

Im Thermocycler wurde dann folgendes PCR-Programm eingestellt:

	1 min 95 °C	} 12 Zyklen
Denaturierung:	1 min 95 °C	
Primerhybridisierung:	1 min 55 °C	
Elongation:	5 min 72 °C	
	5 min 72 °C	
	4 °C	

Die Elongationszeit ist abhängig von der Größe des Plasmids. Die Polymerase amplifiziert ca. 500 Basen in 30 s.

Nach der PCR-Amplifikation wurde 1 µl des Restriktionsenzym DpnI in jedes PCR-Gefäß gegeben und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Das Restriktionsenzym DpnI schneidet die Basenfolge GATC, jedoch nur bei Methylierung des Adenins. Die meisten Bakterienstämme enthalten das dam-Methylierungssystem, sodass die nicht-mutierten Ausgangsplasmide aus methylierter DNA bestehen und somit bei diesem Verdau abgebaut werden. Unmethylierte DNA, wie das PCR-Produkt, kann allerdings nicht verdaut werden. So kann sichergestellt werden, dass nach der Mutagenese nur noch die mutierte DNA vorliegt. Die mutierte Plasmid-DNA ist in ihrer Ringstruktur jeweils am 3'-Ende des Primers unterbrochen. Durch Transformation in kompetente Bakterien konnten die DNA-Stränge geschlossen und nach Vervielfältigung der Zellen, intakte DNA des mutierten Plasmids gewonnen werden [97]. Für die Transformation wurden 5 µl des Restriktionsproduktes eingesetzt.

4.2.8 Hitzeschocktransformation in kompetente Bakterien und Kolonie-PCR

Zur Vervielfältigung des Plasmids wurde dieses in *E.coli*-Bakterien der Linie K12 ER2925 transformiert. Zu den 50 µl aufgetauten kompetenten Bakterien wurden 5 µl des Plasmids gegeben. Das Plasmid sollte dabei eine Konzentration von 1-100 ng/µl haben und wurde zuvor in aqua dest. entsprechend verdünnt. Diese Suspension wurde dann 30 min auf Eis inkubiert und anschließend für genau 30 s in ein 42 °C warmes Wasserbad gegeben. Daran schloss sich erneut eine Inkubation auf Eis an. Nach fünf Minuten wurden 950 µl SOC-Medium zugegeben und die Suspension eine Stunde bei 37 °C und 250 rpm inkubiert, bevor die Bakterien fünf min bei 1.900 g zentrifugiert wurden. Das Pellet wurde in 100 µl 2xTY-Medium aufgenommen. 50 µl davon wurden auf einer 2xTY_{Amp}-Agarplatte (100 µg/ml Amp) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Zur Überprüfung der Mutagenese wurde eine Kolonie-PCR und anschließende Sequenzierung durchgeführt. Dafür wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

10X Puffer	5 μ l
MgCl	3 μ l
dNTP's	0,5 μ l
Primer pHEN	1 μ l
Primer LMB3	1 μ l
Taq Polymerase	0,25 μ l
Aqua dest.	38,25 μ l

Von den Agarplatten wurde dann mit einer Pipettenspitze eine einzelne Kolonie abgenommen und kurz in das PCR-Gefäß getaucht. Die Spitze wurde dann bis zur Auswertung der Kolonie-PCR in ein 50 ml-Gefäß mit 5 ml 2xTY-Medium (100 μ g/ml Amp) gegeben. Insgesamt wurden auf diese Weise von jedem mutierten Plasmid drei Klone analysiert. Dazu wurde folgendes PCR-Programm durchlaufen:

	10 min 95 °C	} 30 Zyklen
Denaturierung:	30 s 95 °C	
Primerhybridisierung:	30 s 55 °C	
Elongation:	45 s 72 °C	
	10 min 72 °C	
	4 °C	

Zur Überprüfung der Kolonie-PCR wurden jeweils 12,5 μ l der PCR Produkte mit 2,5 μ l 6x Ladepuffer auf ein Agarosegel aufgetragen (Gießen des Gels s. S.48). Das Gel wurde für 30 min bei 135 V in die Elektrophoresekammer gestellt. Danach konnten die DNA-Banden unter UV-Licht visualisiert werden.

Nach Auswertung des Gels wurden von jedem Plasmid die Klone ausgewählt, bei denen die Kolonie-PCR erfolgreich war. Von diesen wurden dann auch die Suspensionen in den 50 ml-Gefäßen über Nacht bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Die zugehörigen PCR-Produkte wurden währenddessen für eine Sequenzierung vorbereitet. Durch die Sequenzierung wurde die ortsgerichtete Mutagenese überprüft. Dazu wurden die PCR-Produkte zunächst nach dem QIAquick PCR Purification Kit Protokoll aufgereinigt. Diese aufgereinigten PCR-Produkte wurden dann als Template für die daran anschließende Sequenzierungs-PCR verwendet. Die Sequenzierungs-PCR, die Aufreinigung der Sequenzierungs-PCR-Produkte und die eigentliche Sequenzierung wurden dabei wie unter 4.2.7 auf S. 49 beschrieben durchgeführt.

4.2.9 Gelextraktion, Umklonierung in den Vektor pMS2 und Hitzeschocktransformation in XL1-Blue

Für die Produktion in eukaryontischen Zellen war eine Umklonierung in den Expressionsvektor pMS2 nötig. Dieser Expressionsvektor wurde für die High-Level-Expression und Selektion in eukaryontischen Zellen entwickelt. Er enthält das β -Lactamase-kodierende Gen, was eine bakterielle Selektion unter dem β -Lactam-Antibiotikum Ampicillin ermöglicht. Des Weiteren enthält der Vektor einen Maus-Fc-Teil, mit dem aus den scFv scFv-Fc Fusionsproteine erstellt werden können. Die Fusionsproteine werden durch die Ig- κ -Signalsequenz in den Überstand sezerniert, aus dem sie mit Hilfe des C-terminalen myc-tag oder des sechsfachen Histidin-Tags detektiert und aufgereinigt werden können [98]. Eine interne ribosomale Eintrittsstelle vermittelt zudem die Kotranslation von verstärktem („enhanced“) grün-fluoreszierendem Protein (eGFP), um hierdurch die Transfektionseffizienz überprüfen zu können [99].

Nachdem die Ergebnisse der Sequenzierung vorlagen, wurde von jedem Plasmid eine Probe ausgewählt, bei der die ortsgerichtete Mutagenese erfolgreich war. Mit der zugehörigen Übernachtskultur wurde dann eine Plasmid Mini Präparation nach dem Protokoll des QIAGEN[®] Plasmid Mini Kit durchgeführt. Das getrocknete Plasmid wurde abschließend in 50 μ l aqua dest. aufgenommen. Nach photometrischer Messung des DNA-Gehaltes am Nanodrop wurde das Plasmid bei -20 °C gelagert.

Die Plasmide wurden im Folgenden mit den Restriktionsenzymen NotI und SfiI verdaut wie auf S. 48 beschrieben. Hierfür wurde 1 μ g Plasmid eingesetzt. Die Restriktionsprodukte wurden nach der Hitzeinaktivierung auf ein Gel aufgetragen (100 ml TAE-Puffer mit 1,5 % Agarose und 5 μ l Ethidiumbromid; s. a. S. 48). Das Gel kam für 40 min bei 100 V in die Elektrophoresekammer. Aus dem Gel wurden dann die Bande des jeweiligen scFv Antikörpers (733 bp) ausgeschnitten und nach dem JetQuick Gel Extraction Kit Protokoll aufgereinigt. Im Anschluss wurde der DNA-Gehalt bestimmt.

Vor der Umklonierung in den pMS2-Vektor musste dieser ebenfalls einem Restriktionsverdau unterzogen werden. Bei diesem Verdau sollte der enthaltene Platzhalter (Stuffer) entfernt werden. Dazu wurde 1 μ g Vektor mit 2,5 μ l 10x BSA, 2,5

μl 10x NEBPuffer 4, sowie 1 μl des Restriktionsenzym NotI in ein 1,5-ml-Gefäß gegeben. Das Volumen wurde dann mit aqua dest. auf 24 μl aufgefüllt. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37 °C wurde dann 1 μl des Restriktionsenzym SfiI zugegeben und für eine weitere Stunde bei 50 °C inkubiert. Vor dem Verdau ist der Vektor 7864 bp lang, nach Entfernung des Platzhalters beträgt die Länge noch 7488 bp. Zu den 25 μl des Restriktionsverdau wurden dann 2,75 μl Antarctic Phosphatase 10x-Puffer und 5 Units Antarctic Phosphatase gegeben. Während der folgenden einstündigen Inkubation konnte die Antarctic Phosphatase das Phosphat am 5'-Ende des geschnittenen Vektors entfernen, wodurch ein Religieren des Vektors verhindert werden sollte. Um die Antarctic Phosphatase und das Restriktionsenzym NotI (für SfiI nicht nötig) zu inaktivieren, wurde der Reaktionsansatz im Folgenden für 20 min auf 65 °C erhitzt.

Dieses Restriktionsprodukt wurden nach der Hitzeinaktivierung ebenfalls auf ein Gel aufgetragen (100 ml TAE-Puffer mit 1,5 % Agarose und 5 μl Ethidiumbromid; s. a. S.49). Das Gel kam für 40 min bei 100 V in die Elektrophoresekammer. Aus dem Gel wurde dann die Bande des pMS2-Vektors (7488 bp) ausgeschnitten und nach dem JetQuick Gel Extraction Kit Protokoll aufgereinigt. Im Anschluss wurde der DNA-Gehalt bestimmt, der in diesem Fall 58,5 ng/ μl betrug. Davon sollten 50 ng (\cong 0,86 μl) eingesetzt werden. Damit Insert und Vektor in ein molares Verhältnis von 10:1 gebracht werden konnten, wurde folgende Formel verwendet, um zu errechnen welche Menge des Inserts eingesetzt werden musste:

$$DNA - Menge_{(Insert)}[ng] = \frac{10 \times DNA - Menge_{(vektor)}[ng] \times Länge_{(Insert)}[bp]}{Länge_{(vektor)}[bp]}$$

Daraus ergab sich, dass die eingesetzte DNA-Menge des Inserts hier 49 ng betragen musste. Somit wurden für jeden Ligationsansatz 0,86 μl Vektor und 49 ng des aufgereinigten Inserts verwendet, die mit der entsprechenden Menge aqua dest. auf 17 μl aufgefüllt wurden. Die Suspension wurde für 10 min auf Eis gestellt ehe 2 μl Ligase Puffer und 1 μl T₄-DNA-Ligase dazu gegeben wurden. Im folgenden wurde für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und dann die Ligase 10 min bei 65 °C hitzeinaktiviert.

Im weiteren Verlauf sollten HEK-Zellen mit dem Vektor transfiziert werden. Für diesen Schritt wurde das Plasmid zuvor in *E.coli* XL1-Blue vervielfältigt. Für die Hitzeschocktransformation wurden jeweils 50 µl XL1-Blue auf Eis aufgetaut und mit 0,9 µl β-Mercaptoethanol für 10 min, ebenfalls auf Eis, inkubiert. Danach wurden 2 µl des Ligationsproduktes (\cong 5 ng Vektor) zugesetzt und für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Für die eigentliche Transformation wurden die Suspensionen für 45 s in ein 42 °C warmes Wasserbad und anschließend sofort wieder für 2 min auf Eis gestellt. Nun wurden 950 µl SOC-Medium zugegeben und eine Stunde bei 37 °C und 250 rpm inkubiert, bevor die Bakterien 5 min bei 1.900 g abzentrifugiert wurden. Das Pellet wurde dann in 100 µl 2xTY-Medium resuspendiert. Von dieser Suspension wurden 50 µl direkt auf einer 2xTY_{Amp}-Agarplatte (100 µg/ml Amp) ausplattiert. Auf einer zweiten Platte wurden 50 µl der 1:10 verdünnten Suspension ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Am folgenden Tag wurden von den Agarplatten Klone gepickt und eine Kolonie-PCR sowie eine Gelelektrophorese durchgeführt. Dies geschah wie unter 4.2.8 (s. S. 51) beschrieben, mit dem Unterschied, dass die Elongationszeit hier auf 2 min eingestellt wurde. Die Elongationszeit wurde hier verlängert, da das zu amplifizierende DNA-Stück zwischen den Primern pMS2 3' und 5', also das Fusionsprotein aus scFv-Fragmenten mit Maus-Fc-Teil, eine Länge von 1715 bp besaß. Auch hier wurden von den Klonen der Kolonie-PCR zusätzlich Übernacht-Kulturen angelegt mit denen am folgenden Tag Plasmid Mini Präparationen durchgeführt werden konnten (s. S. 48). Um nun zu überprüfen, ob die Plasmide das richtige Insert enthielten, musste diese nochmals sequenziert werden (s. S. 49).

4.2.10 Transfektion in HEK-Zellen

Mit den Plasmiden, die das richtige Insert enthielten, konnte dann die Transfektion in eukaryontische HEK-Zellen erfolgen. Am Tag vor der Transfektion wurden die HEK-Zellen in einer 24-Well-Platte ausplattiert. Dazu wurden je zwei Wells pro Plasmid mit jeweils 50.000 HEK-Zellen in 1,5 ml Medium befüllt. Da der Vektor ein verstärktes grün-fluoreszierendes Protein („enhanced green fluorescence protein“, eGFP) enthält, konnte anhand des Fluoreszenzsignals die Transfektionseffizienz überprüft werden.

Zusätzlich wurden zwei weitere Wells befüllt, die bei der späteren Messung als Hintergrundkontrolle dienten und nicht transfiziert wurden. Am Tag der Transfektion wurde das Medium zunächst abgenommen und die Wells direkt mit 500 µl neuem Medium aufgefüllt. Nun wurde für jedes Well der Transfektionsmix vorbereitet, bestehend aus 400 ng DNA und der 2,5-fachen Menge an FuGene, der dann mit RPMI auf 100 µl aufgefüllt wurde. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Transfektionsmix tröpfchenweise auf dem jeweiligen Well verteilt und vorsichtig geschwenkt. Während der Inkubation bei 37 °C wurden die Fusionsproteine von den Zellen produziert und durch die Ig-κ-Signalsequenz des pMS2-Vektors in den Überstand sezerniert. Nach 2 Tagen konnte der erste Antikörper-enthaltende Überstand abgenommen werden. Um diesen von möglichen Zellresten zu befreien wurde der Überstand 5 min bei 4.500 g abzentrifugiert. In die Wells wurde währenddessen 500 µl neues Kulturmedium gegeben. Nach einem weiteren Tag konnte erneut Antikörper-enthaltender Überstand abgenommen und abzentrifugiert werden.

Anschließend wurde die Transfektionseffizienz der HEK-Zellen im Durchflusszytometer getestet. Dadurch konnte festgestellt werden, wie viele der HEK-Zellen den pMS2-Vektor durch die Lipofektion aufgenommen hatten. Je höher die Aufnahme ist, desto mehr Antikörper können produziert werden. Die Zellen, die das Plasmid aufgenommen hatten, fluoreszierten grün, da der Vektor auch das grün fluoreszierende Protein enthält, welches dann von den Zellen exprimiert wird. Im Vergleich mit nicht-transfizierten Zellen konnte so die Effizienz der Transfektion bestimmt werden.

4.2.11 Testung der produzierten Antikörper

Die Produktion der Antikörper in den HEK Zellen wurde mittels SDS-Gel mit anschließender Coomassie-Färbung und im Western Blot überprüft. Anschließend wurde die Bindeaktivität der Antikörper im ELISA auf immobilisierten Membranfragmenten und im Durchflusszytometer auf vitalen Zellen untersucht. Da es sich bei den hergestellten Antikörpern um scFv Maus-Fc Fusionsproteine handelte, erfolgte der Nachweise der Antikörper im Durchflusszytometer, ELISA und Western Blot jeweils mit einem anti-Maus-Antikörper.

Western Blot und Coomassie-Färbung:

Für die SDS-Gelelektrophorese wurden die Proben in gleichem Verhältnis mit 2x Sample-Puffer gemischt und 10 min bei 70 °C inkubiert. Nachdem das Gel in die Kammer gesetzt wurde, wurde diese mit Laufpuffer gefüllt und der Kamm entfernt. Dann wurden die Taschen des Gels wie folgt beladen:

Die linke Hälfte des Gels wurde für den Western Blot verwendet:

4 µl Color Marker | je 10 µl der Proben | 3 µl Magic Marker

Der Magic Marker wurde zuvor 1:5 in Sample-Puffer verdünnt. Dieser Marker ist nur auf dem entwickelten Röntgenfilm zu sehen, da an diesen ebenfalls der Sekundär-Antikörper bindet.

Die zweite Hälfte des Gels wurde für die Coomassie-Färbung eingesetzt:

4 µl Color Marker | je 10 µl der Proben | Positiv-Kontrolle

Die Laufkammer wurde an den Stromgenerator angeschlossen und bei 200 V 55 min laufen lassen. Danach wurde das Gel in der Mitte durchgeschnitten und mit beiden Hälften getrennt weiter gearbeitet.

Das Gel für den Western Blot wurde in die vorbereitete Blotting-Kassette gegeben. Zuvor wurde die Membran mit Methanol aktiviert. Die Kassette wurde dann in die Blotting-Apparatur gesetzt, die mit Blotting-Puffer aufgefüllt wurde. Außerdem wurde die Apparatur von innen und außen mit Eis gekühlt. Anschließend wurde die Apparatur mit dem Stromgenerator verbunden und für 45 min bei 100 V laufen lassen.

Für den spezifischen Nachweis der scFv-Fc Fusionsproteine wurde die Membran dann in TBST für 2 min auf einem Schüttler gespült und danach für 1 h in Blocking-Lösung auf den Schüttler gestellt. Dann wurde die Membran zum Sekundär-Antikörper (Rabbit-anti-mouse HRP) gegeben, der zuvor in 15 ml Blocking-Lösung 1:5.000 verdünnt wurde. Nach einer einstündigen Inkubation bei 4 °C auf einem Schüttler wurde die Membran dann 5 Mal für 5 min in TBST auf dem Schüttler gewaschen. Währenddessen wurden die Farbstoffe für die Chemilumineszenz gemischt. Dazu wurden 500 µl Lösung A und 500 µl Lösung B zusammengegeben. Die Membran wurde in die Entwicklerkassette gelegt und der Farbstoff darüber gegeben. In einem

abgedunkelten Raum wurde der Film dann entsprechend der Signalstärke aufgelegt und danach nacheinander in ein Entwickler-, Fixierer- und Wasserbad eingetaucht.

Coomassie-Färbung:

Die zweite Hälfte des Gels aus der SDS-Gelelektrophorese wurde 3 Mal für 5 min auf dem Schüttler in aq. dest. gewaschen. Währenddessen wurde eine Arbeitslösung aus 18 ml ProtoBlue Safe und 2 ml 100 % Ethanol hergestellt. Diese Lösung wurde dann zum Gel gegeben und für 4-5 h auf einem Schüttler färben lassen. Das Gel wurde abschließend mit aqua dest. auf dem Schüttler gewaschen, um die Hintergrundfärbung zu minimieren.

Durchflusszytometer:

Im Durchflusszytometer wurde die spezifische Bindung der scFv-Maus-Fc-Fusionsproteine getestet. Dazu wurden von den zu testenden Zelllinien (NCI-H82, NCI-H69, DMS 273) und PBMC-Zellen jeweils ca. $0,2-0,5 \times 10^6$ Zellen abgenommen, in Waschpuffer (PBS mit 0,2 % BSA, 0,1 % Azid) gewaschen und dann 5 min bei 500 g pelletiert. Die Pellets wurden dann in 100 μ l scFv-Fc Fusionsprotein-enthaltenden Zellkulturüberstand der transfizierten HEK-Zellen resuspendiert und 30 min bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde 1 ml Waschpuffer zugegeben und erneut zentrifugiert. Die Pellets wurde in je 100 μ l Waschpuffer aufgenommen und mit 2 μ l FITC-markiertem Goat anti-mouse Antikörper für 30 min bei 4 °C inkubiert. Es wurde erneut 1 ml Waschpuffer zugegeben und zentrifugiert. Dann wurden die Pellets in 1 % Paraformaldehyd aufgenommen und konnten im Durchflusszytometer analysiert werden. An den Sekundär-Antikörper (FITC-markierter Goat anti-mouse Antikörper) ist ein Fluorochrom gekoppelt, welches durch Anregung des Durchflusszytometer-Lasers ein grünes Fluoreszenzsignal abgibt.

ELISA:

Für den ELISA wurde für jeden zu testenden Antikörper (scFv-Maus-Fc-Fusionsprotein) in je zwei Wells einer Immuno-Mikrotiterplatte 1:10 in PBS verdünnte MF der SCLC-Zelllinie NCI-H82 und als Negativkontrolle ebenfalls 1:10 verdünnte MF von PBMC-Zellen gegeben. Außerdem wurde jeweils in zwei weitere Wells 100 μ l

in PBS verdünntes BSA (1µg/Well) gegeben, um mögliche unspezifische Bindungen gegenüber Proteinen zu detektieren. Außerdem wurde mit jedem Antigen noch zwei weitere Wells vorbereitet, in die später nur der Sekundär-Antikörper gegeben wurde, um das Hintergrundsignal zu ermitteln. Diese Platte wurde bei 4 °C über Nacht inkubiert.

Die Überstände der HEK-Zellen von beiden Abnahme-Tagen wurden zusammengegeben und die benötigte Menge für 2 h in gleicher Menge 4 % MPBS auf einem Rotator geblockt. Nachdem die Immuno-Mikrotiterplatte drei Mal mit PBS gewaschen wurde, wurde diese ebenfalls für 2 h bei 250 rpm mit 2 % MPBS geblockt. Nachdem die Platte drei Mal mit PBS gewaschen wurde, wurden je 100 µl der geblockten Antikörper zugegeben und 1 h bei 250 rpm inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden 100 µl des 1:25.000 in 2 % MPBS verdünnten Sekundär-Antikörpers (Rabbit anti-Maus HRP) zugegeben und erneut 1 h inkubiert. Nach einem letzten Waschschrift wurden 100 µl TMB in jedes Well gegeben. Nach 15 min wurde die Reaktion mit gleicher Menge 2 M Schwefelsäure abgestoppt und die Messung bei 450 nm (Referenzwellenlänge: 690 nm) durchgeführt.

5 Ergebnisse

Die folgenden Ergebnisse wurden nach der chronologischen Abfolge der Versuche gegliedert.

5.1 Anreicherungsfaktor der scFv-Phagen auf FFPE-Schnitten

Um SCLC-spezifische Antikörper-Fragmente zu generieren wurden die humanen scFv-Antikörperbibliotheken Tomlinson I und J in drei aufeinanderfolgenden Selektionsrunden auf Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten (FFPE-Schnitten) eingesetzt. Bei diesen Gewebeschnitten handelte es sich um Patientenmaterial aus der Routinediagnostik. Während jeder Runde erfolgte zunächst eine Depletion (negative Selektion) auf FFPE-Schnitten gesunden Lungengewebes, um eine Antikörperanreicherung gegen nicht krankheitsrelevante Antigene zu erreichen. Danach wurde jeweils die positive Selektion auf dem SCLC-Gewebe durchgeführt (siehe auch 4.2.2, S. 42). Von Runde zu Runde wurde die Waschstringenz gesteigert und dadurch der Selektionsdruck auf bindungsaffinere Antikörper erhöht. Die antigenbindenden Phagen wurden dann durch alkalische Elution gewonnen und ihre Konzentration titriert. Die Eingangs-Titer (Input-Titer) wurden dabei jeweils direkt vor der Depletion (4.1.1), die Ausgangs- (Output-)Titer jeweils direkt nach der Elution bestimmt (4.1.2).

In Tabelle 4 wurden die ermittelten Antikörper-Titer für die Bibliothek I und in Tabelle 5 für die Bibliothek J aufgelistet, sowie die jeweils darauf basierend berechneten Verhältnisse von Input- zu Output-Titer. Dieses Input-/Output-Titer-Verhältnis der zweiten bzw. dritten Selektionsrunde wurde dann jeweils mit dem Titerverhältnis der ersten Selektionsrunde verglichen, wobei sich sowohl für die Antikörper-Bibliothek I als auch für die Antikörper-Bibliothek J eine Abnahme des Titerverhältnisses von Selektionsrunde zu Selektionsrunde zeigte.

Tomlinson-Antikörper-Bibliothek I:

Tabelle 4: Antikörper-Titer für Tomlinson-Antikörper-Bibliothek I. Eingesetzt wurden der Hyperphage (1. Selektionsrunde), sowie der Helferphage (2. und 3. Selektionsrunde). Dargestellt sind jeweils der Eingangs- und Ausgangstiter vor bzw. nach den einzelnen Selektionsrunden, sowie die daraus berechneten Verhältnisse von Input- zu Output-Titer. Die Titerverhältnisse der 2. und 3. Selektionsrunde wurden dann mit dem Titerverhältnis der ersten Runde verglichen. Insgesamt zeigt sich keine Anreicherung von Runde zu Runde, sondern vielmehr eine Abnahme des Verhältnisses von Input- zu Output-Titer.

<u>Eingesetzter Phage</u>	<u>Runde</u>	<u>Eingangstiter [cfu/ml]</u>	<u>Ausgangstiter [cfu/ml]</u>	<u>Titer-verhältnis</u>	<u>Anreicherung</u>
Multivalent Hyperphage	1	$1,95 \times 10^{12}$	$5,75 \times 10^7$	$2,9 \times 10^{-5}$	
Monovalent Helferphage	2	$7,15 \times 10^{13}$	$1,15 \times 10^8$	$1,6 \times 10^{-6}$	0,055fach
Monovalent Helferphage	3	$4,46 \times 10^{13}$	$2,5 \times 10^7$	$5,6 \times 10^{-7}$	0,019fach

Tomlinson-Antikörper-Bibliothek J:

Tabelle 5: Antikörper-Titer für Tomlinson-Antikörper-Bibliothek J. Hier wurden ebenfalls in der ersten Selektionsrunde der Hyper- und in der zweiten und dritten Selektionsrunde der Helferphage eingesetzt. Auch für die Antikörper-Bibliothek J zeigt sich eine Abnahme der Titerverhältnisse von Runde zu Runde.

<u>Eingesetzter Phage</u>	<u>Runde</u>	<u>Eingangstiter [cfu/ml]</u>	<u>Ausgangstiter [cfu/ml]</u>	<u>Titer-verhältnis</u>	<u>Anreicherung</u>
Multivalent Hyperphage	1	$2,5 \times 10^{12}$	$4,91 \times 10^7$	2×10^{-5}	
Monovalent Helferphage	2	$4,65 \times 10^{13}$	$4,3 \times 10^6$	$9,2 \times 10^{-8}$	$4,6 \times 10^{-3}$ fach
Monovalent Helferphage	3	$3,26 \times 10^{13}$	$7,2 \times 10^6$	$2,2 \times 10^{-7}$	0,011fach

5.2 Überprüfung der Anreicherung SCLC-spezifischer Phagen-Antikörper in der polyklonalen Durchflusszytometrie

Um die Anreicherung SCLC-spezifischer Phagen-Antikörper zu überprüfen, wurde die Bindeaktivität der gewonnenen Selektionsfraktionen auf der SCLC-Zelllinie NCI-H82 sowohl für die Antikörperbibliothek I, als auch für J getestet (zur Vorbereitung der Analyse siehe auch Kap. 4.2.3, S. 45). Durch einen fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper konnte die Bindung der Phagen-Antikörper an die SCLC-Zellen nachgewiesen und somit der Anteil an SCLC-spezifischen Bindern innerhalb der Original-Bibliotheken und der einzelnen Selektionsrunden verglichen werden.

Hierfür wurden die NCI-H82 mit den Phagen der Original-Bibliotheken und der drei Selektionsrunden inkubiert. Ein ansteigendes Fluoreszenzsignal wies hierbei auf die Anreicherung spezifischer Binder hin. Als Hintergrundkontrolle wurden Zellen nur mit dem FITC-markierten Sekundärantikörper gefärbt.

Phagen-Bibliothek I:

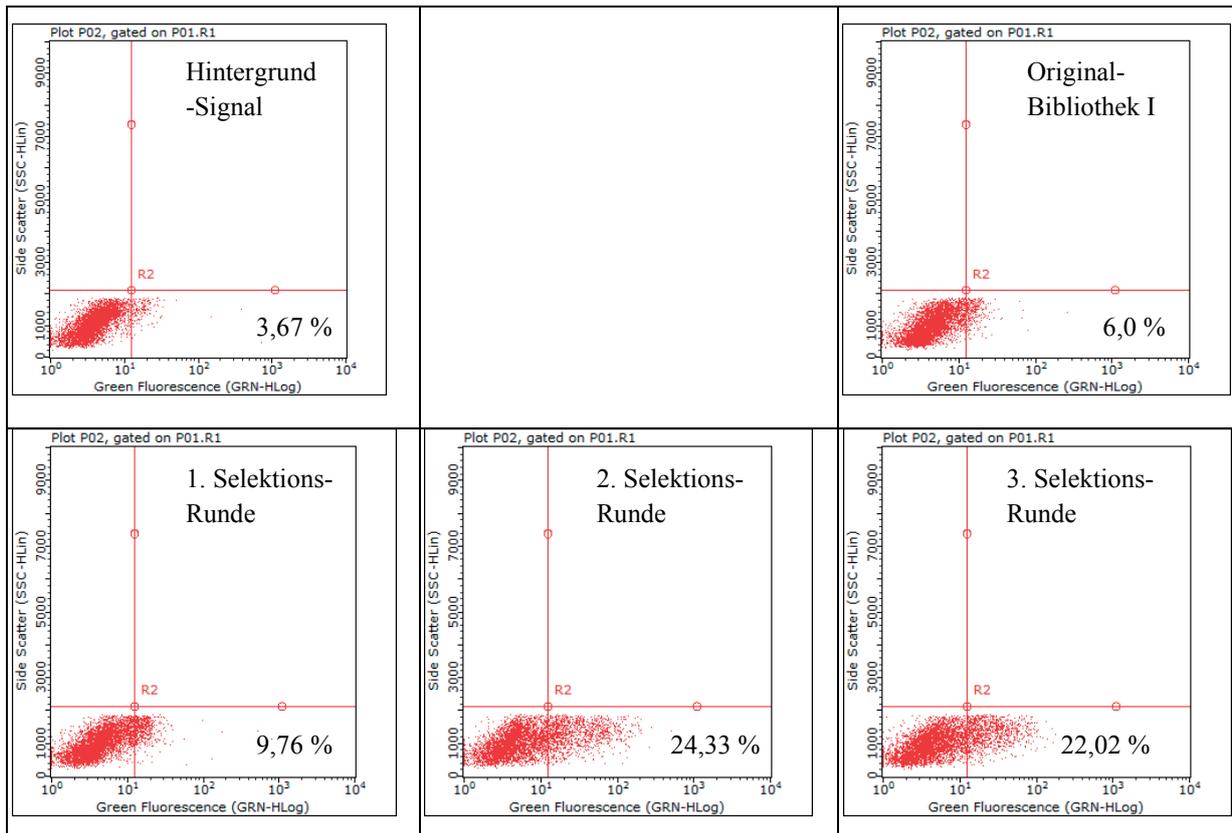


Abbildung 2: SCLC-spezifische Phagen-Antikörper aus der Antikörper-Bibliothek I, getestet auf der Zelllinie NCI-H82 in der polyklonalen Durchflusszytometrie. Die Grafik oben links zeigt das Hintergrundsignal der NCI-H82-Zellen, auf die nur der Sekundär-Antikörper, jedoch keine Phagenpartikel gegeben wurden (hier: 3,67 %). Bei Zugabe der Original-Phagen-Bibliothek I (Grafik oben rechts) zur Zelllinie NCI-H82 wurde ein Fluoreszenzsignal von 6 % gemessen. Die unten stehenden Grafiken zeigen die Fluoreszenzsignale, die bei der Testung der Selektionsrunden ermittelt wurden. Nach der ersten Selektionsrunde wurde ein Fluoreszenzsignal von 9,76 % gemessen, nach der zweiten Selektionsrunde wurde ein Fluoreszenzsignal von 24,33 % gemessen. Dieser Wert sank jedoch nach der dritten Selektionsrunde leicht auf 22,02 % ab.

Das Hintergrundfluoreszenz-Signal des Sekundärantikörpers betrug 3,67 % (siehe Abbildung 2). Vor der ersten Selektionsrunde wurden 6 % der Zellen von Antikörpern aus der Original-Bibliothek I erkannt. Die Fluoreszenzsignale stiegen während der Selektionsrunden auf 9,67 % nach der ersten und 24,33 % nach der zweiten Selektionsrunde. Nach Abschluss der dritten Selektionsrunde sank das Fluoreszenzsignal leicht auf 22,02 % ab. Insgesamt kam es vom Ausgangszustand vor

der Selektion bis zum Abschluss der dritten Selektionsrunde zu einem relativen Anstieg des Fluoreszenzsignals von 16,02 %, was für eine Anreicherung SCLC-spezifischer Antikörper spricht.

Phagen-Bibliothek J:

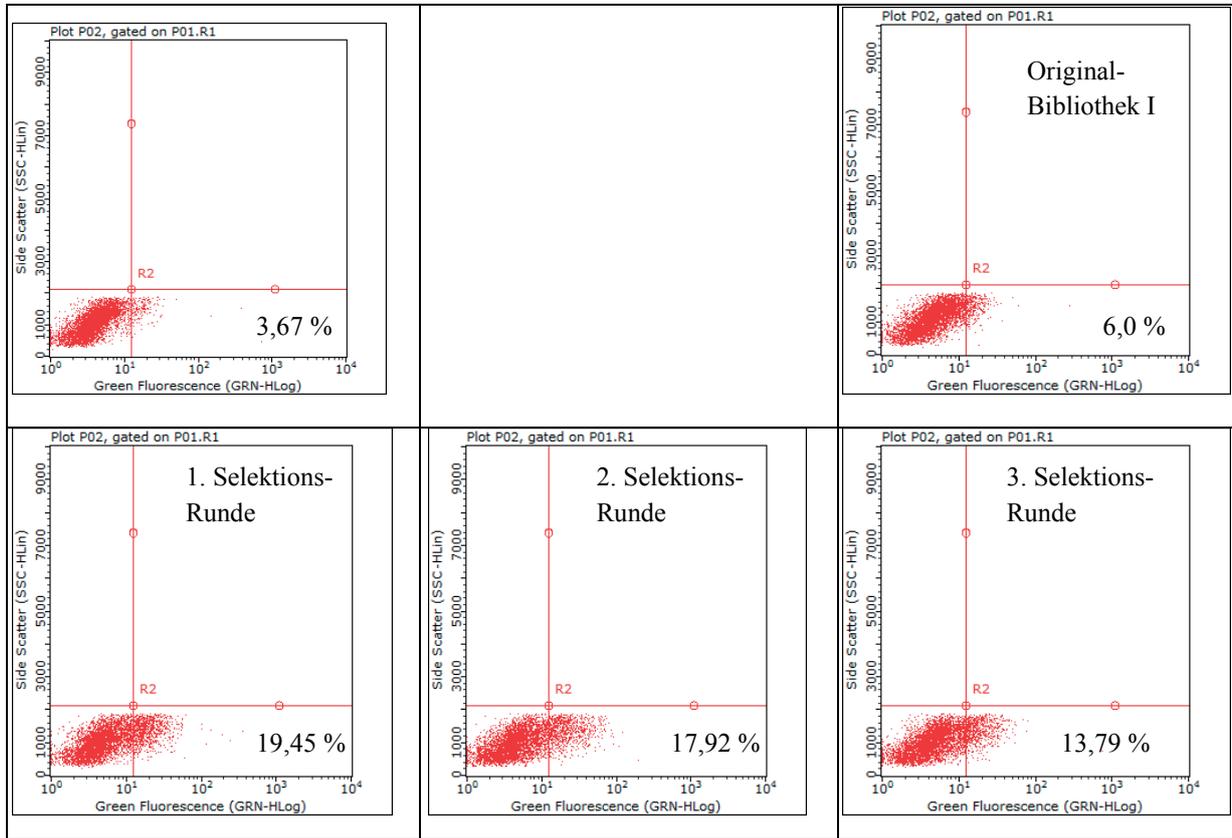


Abbildung 3: SCLC-spezifische Phagen-Antikörper aus der Antikörper-Bibliothek J, getestet auf der Zelllinie NCI-H82 in der polyklonalen Durchflusszytometrie. Die Grafik oben links zeigt erneut das Hintergrundsignal der NCI-H82-Zellen mit Sekundäntikörper ohne Zugabe von Phagenpartikeln (3,67 %). Bei Zugabe der Original-Phagen-Bibliothek J (Grafik oben rechts) zur Zelllinie NCI-H82 wurde, wie bei der Phagen-Bibliothek I ein Fluoreszenzsignal von 6 % ermittelt. Die unten stehenden Grafiken zeigen die Fluoreszenzsignale, die bei der Testung der Selektionsrunden ermittelt wurden. Nach der ersten Selektionsrunde wurde ein Fluoreszenzsignal von 19,45 % gemessen. Dieser Wert sank jedoch leicht auf 17,92 % (zweite Selektionsrunde), bzw. 13,79 % (dritte Selektionsrunde).

Auch bei Verwendung der Original-Phagen-Bibliothek J wurden, identisch zur Phagen-Bibliothek I, 6 % der Zellen von Antikörpern erkannt (siehe Abbildung 3). Nach der ersten Selektionsrunde stieg das gemessene Fluoreszenzsignal auf 19,45 %, nach der zweiten Selektionsrunde betrug dieser Wert 17,92 % und nach der dritten Selektionsrunde 13,79 %. Insgesamt lässt sich für die Phagen-Bibliothek J festhalten,

dass es vom Ausgangszustand vor der Selektion bis zum Abschluss der dritten Selektionsrunde zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals um 7,79 % kam.

Durch den Anstieg des Fluoreszenzsignals konnte eine Anreicherung SCLC-spezifischer Antikörper im Phagenpool gezeigt werden. Im Anschluss wurde der Test ein weiteres Mal durchgeführt. Dabei wurden zusätzlich zu der SCLC-Zelllinie NCI-H82 auch die SCLC-Zelllinien NCI-H69 und DMS-273, sowie als Negativkontrolle PBMC-Zellen getestet. Für jede dieser Zelllinien wurden nun die Original-Phagen-Bibliothek I bzw. J, sowie deren 3. Selektionsrunde getestet, um zu überprüfen, ob die Anreicherung SCLC-spezifischer Antikörper auch auf den anderen SCLC-Zelllinien bestätigt werden konnte.

NCI-H82:

Für die Zelllinie NCI-H82 (siehe Tabelle 6) konnte bestätigt werden, dass der Anteil an SCLC-spezifischen Antikörpern nach der 3. Selektionsrunde höher war als vor der Selektion, was sich in einer Zunahme des Fluoreszenzsignals widerspiegelt. Daher wurden von den scFv-präsentierenden Phagen der 3. Selektionsrunden mehr Zellen gebunden, wodurch der Anteil an antikörpermarkierten Zellen 11,93 % für die Phagen-Bibliothek I und 12,03 % für die Phagen-Bibliothek J betrug. Mit einer Erhöhung dieses Anteils um 7,4 % (Phagen-Bibliothek I) bzw. 9,44 % (Phagen-Bibliothek J) ist die Anreicherung zwar etwas schwächer als im ersten Versuch, jedoch ist der Anstieg auch hier nachweisbar.

NCI-H69:

Für die Zelllinie NCI-H69 (siehe Tabelle 7) wurde nach der dritten Selektionsrunde ein relativer Anteil antikörpermarkierter Zellen von 5,81 % (Phagen-Bibliothek I) bzw. 8,31 % (Phagen-Bibliothek J) nachgewiesen. Vom Ausgangszustand bis zum Ende der Selektion bedeutete dies einen Anstieg antikörpermarkierter Zellen um 1,97 % (Phagen-Bibliothek I), bzw. 4,74 % (Phagen-Bibliothek J).

DMS-273:

Für die Zelllinie DMS 273 (siehe Tabelle 8) konnten nach der Selektion ein Anteil an durch Antikörper erkannten Zellen von 3,51 % (Phagen-Bibliothek I) bzw. 8,53 % (Phagen-Bibliothek J) nachgewiesen werden. Vom Ausgangszustand bis zum Ende der

Selektion konnte somit ein Anstieg dieses Anteils um 2,84 % (Phagen-Bibliothek I), bzw. 7,24 % (Phagen-Bibliothek J) gemessen werden. Für die beiden hier zusätzlich getesteten SCLC-Zelllinien NCI-H69 und DMS 273 konnte also ebenfalls ein Anstieg des Fluoreszenzsignals und somit eine Zunahme des Anteils antikörpermarkierter Zellen durch die Selektionen nachgewiesen werden, jedoch ist diese Zunahme, ebenso wie der relative Anteil an erkannten Zellen nach der 3. Selektionsrunde schwächer als bei der NCI-H82-Zelllinie.

PBMC:

Um zu überprüfen, ob es sich um eine SCLC-spezifische Anreicherung der Antikörper handelte, wurde eine Messung auf PBMC-Zellen durchgeführt (siehe Tabelle 9). Hier zeigt sich mit 1,0 % (für Phagen-Bibliothek I) und 3,04 % (für Phagen-Bibliothek J) zwar auch ein minimaler Anstieg des Anteils der antikörpermarkierten Zellen, jedoch ist das Signal mit 1,82 % (Phagen-Bibliothek I) bzw. 3,04 % (Phagen-Bibliothek J) im Vergleich zu den SCLC-Zelllinien deutlich schwächer, was für die Spezifität der Binder spricht.

Insgesamt zeigte sich für alle SCLC-Zelllinien eine Anreicherung SCLC-spezifischer Antikörper im Phagenpool durch die Selektionsrunden, was sich in einer Zunahme des Fluoreszenzsignals widerspiegelt. Bei Verwendung der PBMC-Zelllinie war nur ein schwacher Anstieg des Fluoreszenzsignals messbar. Des Weiteren war die Anreicherung der SCLC-spezifischen Antikörper im Phagenpool bei der Verwendung der Phagen-Bibliothek J stärker als bei Verwendung der Phagen-Bibliothek I. Zum besseren Vergleich sind die Ergebnisse der Durchflusszytometrie im Folgenden nochmals in einer tabellarischen Übersicht dar gestellt:

Tabelle 6: NCI-H82 mit Phagen aus den Bibliotheken I und J in der polyklonalen Durchflusszytometrie.

Die Zunahme des Fluoreszenzsignals zeigt, dass der Anteil an antikörpermarkierten NCI-H82-Zellen nach den drei Selektionsrunden um 7,39 % (Phagen-Bibliothek I) bzw. 9,44 % (Phagen-Bibliothek J) größer war als vor den Selektionsrunden.

Probe	neg. (%)	pos. (%)	Anstieg um (%)
NCI-H82 nur Sekundärantikörper	96,36	3,64	
NCI-H82 i original	95,46	4,54	
NCI-H82 i 3. Selektionsrunde	88,07	11,93	7,39
NCI-H82 J original	97,41	2,59	
NCI-H82 J 3. Selektionsrunde	87,97	12,03	9,44

Tabelle 7: NCI-H69 mit Phagen aus den Bibliotheken I und J in der polyklonalen Durchflusszytometrie.

Der Anteil antikörpermarkierter NCI-H69-Zellen nach den drei Selektionsrunden war um 1,97 % (Phagen-Bibliothek I) bzw. 4,74 % (Phagen-Bibliothek J) größer, als vor den Selektionsrunden. Die Zunahme des Fluoreszenzsignals war jedoch geringer als bei der Zelllinie NCI-H82.

Probe	neg. (%)	pos. (%)	Anstieg um (%)
NCI-H69 nur Sekundärantikörper	97,23	2,77	
NCI-H69 i original	96,16	3,84	
NCI-H69 i 3. Selektionsrunde	94,19	5,81	1,97
NCI-H69 J original	96,43	3,57	
NCI-H69 J 3. Selektionsrunde	91,69	8,31	4,74

Tabelle 8: DMS 273 mit Phagen aus den Bibliotheken I und J in der polyklonalen Durchflusszytometrie.

Der Anteil, der von Antikörpern erkannten DMS 273-Zellen nach den drei Selektionsrunden war um 2,84 % (Phagen-Bibliothek I) bzw. 7,24 % (Phagen-Bibliothek J) größer, als vor den Selektionsrunden, was sich in einer Zunahme des Fluoreszenzsignals widerspiegelt. Damit ist der Anstieg des Anteils antikörpermarkierter Zellen hier ebenfalls etwas geringer als bei Verwendung der Zelllinie NCI-H82.

Probe	neg. (%)	pos. (%)	Anstieg um (%)
DMS 273 nur Sekundärantikörper	99,02	0,98	
DMS 273 i original	99,34	0,67	
DMS 273 i 3. Selektionsrunde	96,49	3,51	2,84
DMS 273 J original	98,71	1,29	
DMS 273 J 3. Selektionsrunde	91,47	8,53	7,24

Tabelle 9: PBMC-Zellen mit Phagen aus den Bibliotheken I und J in der polyklonalen Durchflusszytometrie.

Mit einem Anstieg von 1 % (Phagen-Bibliothek I) bzw. 3,04 % (Phagen-Bibliothek J) ist der Anstieg des Fluoreszenzsignals und somit des Anteils an antikörpermarkierten Zellen hier schwächer als bei den SCLC-Zelllinien.

Probe	neg. (%)	pos. (%)	Anstieg um (%)
PBMC nur Sekundärantikörper	98,52	1,48	
PBMC i original	99,18	0,82	
PBMC i 3. Selektionsrunde	98,18	1,82	1
PBMC J original	100	0	
PBMC J 3. Selektionsrunde	96,96	3,04	3,04

5.3 Monoklonaler ELISA

Zur Überprüfung der spezifischen Bindeaktivität einzelner Klone aus der Antikörperphagen-Selektion wurde ein monoklonaler ELISA durchgeführt (siehe 4.2.4, S. 46). Die vereinzelt Klone aus den angelegten Masterplatten wurden dabei auf immobilisierten Membranfragmenten der Zelllinie NCI-H82 (SCLC-Zelllinie) getestet. Um das Hintergrundsignal zu ermitteln wurden außerdem pro Platte zwei Wells ohne Phagenzugabe und zwei weitere Wells nur mit TMB als Negativkontrollen gemessen. Als Positivkontrolle dienten jeweils zwei mit CD30 beschichtete Wells, denen der CD30-spezifische Ki-4-Phagen-Antikörper zugegeben wurde. Von den Selektionsplatten der Bibliotheken I und J wurden auf diese Weise jeweils 88 Klone untersucht.

Von den 88 untersuchten Phagen-Antikörpern der Phagen-Bibliothek I zeigten 49 in der Untersuchung ein Signal, das Zehn- bis 100-fach über dem Hintergrundsignal lag. Alle anderen Testfelder zeigten ein Signal, das schwächer war als das Zehnfache des Hintergrundes (Masterplatte I1).

Von den 88 untersuchten Phagen-Antikörpern aus der Phagen-Bibliothek J wurden für 31 Phagen-Antikörper schwache Bindungsstärken gemessen (Absorptionssignal 10- bis 100-fach über dem Hintergrundsignal), ein Phagen-Antikörper zeigte eine moderate Bindungsstärke (Absorptionssignal 100- bis 200-fach über dem Hintergrundsignals) und für acht Phagen-Antikörper wurden starke Bindungsstärken gemessen (Absorptionssignal größer als das 200-fache des Hintergrundsignals; Masterplatte J1).

Da im monoklonalen ELISA aus der Phagen-Bibliothek J der Signalanstieg gegenüber dem Hintergrundsignal wesentlich größer war als für I wurde im weiteren Verlauf

ausschließlich mit der Phagen-Bibliothek J weitergearbeitet. Aus dieser Bibliothek wurden dann zwei weitere Masterplatten erstellt (Masterplatten J2 und J3) und nach oben genannter Methode untersucht. Auch bei der Untersuchung dieser Platten zeigten sich wieder Phagen-Antikörper mit schwachen, moderaten und starken Bindungsstärken (siehe Tabelle 10). Für die Phagen-Bibliothek J fanden sich auf den drei Masterplatten insgesamt:

Tabelle 10: Auswertung der monoklonalen ELISA-Untersuchungen der J-Masterplatten. Gezeigt ist jeweils die Anzahl der Phagen-Antikörper (gesamt: 264), die eine bestimmte Absorptionssignalstärkenanhebung im Vergleich zum Hintergrundsignal zeigten. Anhand dieser Signalanhebung wurden die Binder in schwache, moderate und starke Binder eingeteilt.

Signalstärke im Vergleich zum Hintergrundsignal	Anzahl der Phagen-Antikörper	Anteil an den insgesamt untersuchten Phagen-Antikörper [%]
<10-fach	186	70,45
Schwach (10 – <100-fach)	55	20,83
Moderat (100 – <200-fach)	7	2,65
Stark (>200-fach)	16	6,06
<u>Gesamt:</u>	264, davon 78 positiv (30 %)	

Von diesen Phagen-Antikörpern wurden nun insgesamt zwölf starke, vier moderate und zwei schwache Binder ausgewählt und von diesen eine so genannte Kompressionsplatte angelegt, um die Bindeaktivität dieser Klone erneut zu bestätigen.

5.4 Monoklonaler ELISA der Kompressionsplatte

Um eine mögliche unspezifische Bindeaktivität auszuschließen, wurden die 18 Phagen-Antikörper aus den J-Kompressionsplatten in diesem zweiten ELISA zusätzlich auch auf BSA als irrelevantem Protein und auf Membranfragmenten von PBMC-Zellen getestet. Diese Messung erfolgte 10 Minuten nach Zugabe von TMB ebenfalls bei 450 nm (Referenzwellenlänge: 690 nm). Auch hier wurden als Positiv-Kontrolle zwei Wells mit CD30 gecoatet, denen dann Ki-4-Phagen-Antikörper zugesetzt wurden. Um das Hintergrundsignal zu ermitteln wurden jeweils Wells mit BSA, PBMC-Membranfragmenten und NCI-H82-Membranfragmenten ohne Zugabe von Phagen-Antikörpern untersucht.

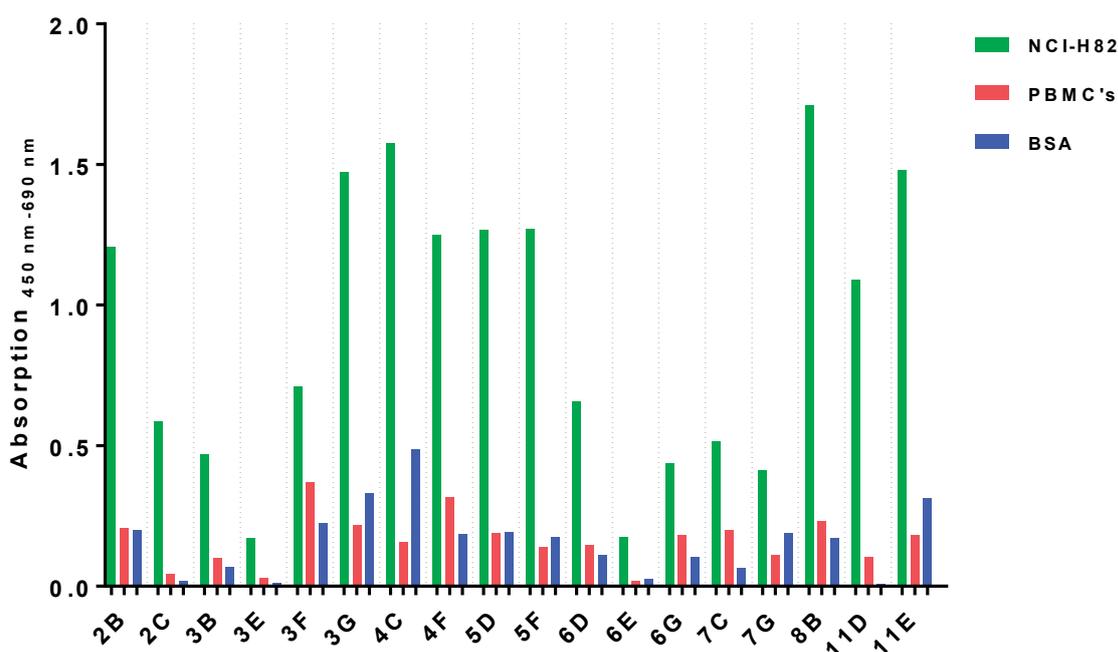


Abbildung 4: monoklonaler ELISA von der Kompressionsplatte. 18 ausgewählte Phagen-Antikörper wurden im monoklonalen ELISA auf Membranfragmenten der SCLC-Zelllinie NCI-H82 (grün), sowie als Negativkontrollen auf BSA (blau) als irrelevantem Protein und Membranfragmenten von PBMC-Zellen (periphere mononukleäre Blutzellen; rot) getestet. Für alle Klone zeigte sich dabei eine deutlich stärkere Signalanhebung auf den SCLC-Zellen, als auf den Negativkontrollen. [Messung bei 450 nm (Referenzwellenlänge: 690 nm); GraphPad Prism 6-Software].

Auch hier wurde, wie in Kap. 5.3 wieder in starke (Signalanhebung >200-fach über dem Hintergrundsignal), moderate (Signalanhebung 100-200-fach über dem Hintergrundsignal) und schwache (Signalanhebung 10-100-fach über dem Hintergrundsignal) Binder unterteilt. Die Klone wurden nach den Wells auf der Masterplatte benannt, aus der sie entnommen wurden. Für neun der starken Binder aus Kap. 5.3 konnte ein moderates Signal auf den NCI-H82-Membranfragmenten gemessen werden. Dabei handelte es sich um die Binder 2B, 3G, 4C, 4F, 5D, 5F, 8B, 11D und 11E. Somit gehörten diese Binder auch in diesem Versuch zu den stärksten Bindern. Auf den PBMC-Membranfragmenten und auf BSA fand sich für diese Binder ebenfalls ein schwacher Signalanstieg, der jedoch nur maximal ein Viertel des Signals auf den SCLC-Membranfragmenten ausmachte. Für die drei übrigen starken Binder aus Kap. 5.3 (2C, 3B, 3F) konnte das starke Signal auf den SCLC-Membranfragmenten aus dem vorherigen ELISA nicht bestätigt werden, die Signalstärke lag hier maximal 65-fach über dem Hintergrundsignal. Jedoch ist das Signal auf den SCLC-Membranfragmenten immer noch mehr als doppelt so groß wie auf BSA und PBMC-Membranfragmenten.

Für die mittelstarken (3E, 6D, 7C) und schwachen (6E, 6G) Binder aus Kap. 5.3 konnte erneut nur ein schwaches Signal (Signalstärke 17- bis 43-fach über der Hintergrundsignalstärke) auf den NCI-H82-Membranfragmenten bestätigt werden. Aber auch bei diesen schwachen Bindern war das Signal dennoch mehr als doppelt so hoch wie auf den PBMC-Zellen und auf BSA. Alle 18 untersuchten Klone wurden in einem weiteren Schritt sequenziert, um zu überprüfen, um wie viele einzigartige Klone es sich hierbei handelte.

5.5 Sequenzierung

Um die DNA-Sequenzen der 18 Phagen-Antikörper der Kompressionsplatte zu erhalten, wurden diese für eine Sequenzierung vorbereitet (siehe 4.2.5 - 4.2.7). Zum Vorgehen bei der Sequenzierung s. S. 49. Mithilfe der Sequenzierung sollte überprüft werden, wie viele unterschiedliche Binder auf der Kompressionsplatte vorhanden waren. Außerdem wurde überprüft, ob die DNA-Sequenzen Amber Stopp-Codons (TAG) enthielten, welche sich bei der Tomlinson Bibliothek häufig finden lassen. Der bisher verwendete TG1-Bakterienstamm ist in der Lage beim Ablesen des Stopp-Codons anstelle einer Termination die Aminosäure Glutamin einzufügen. Diese Eigenschaft haben die später verwendeten Produktionszellen nicht. Daher mussten die Stopp-Codons identifiziert und entfernt werden.

Bei der Sequenzierung zeigte sich, dass neun der 18 untersuchten Klone identisch waren (3G, 4C, 5D, 5F, 2B, 8B, 11E, 4F, 6G; im folgenden 3G genannt), ein weiterer Klon kam zweimal vor (3B, 7C; im folgenden 3B genannt), die anderen jeweils einmal. Rückblickend zeigten sich in Kap. 5.4 für die neun identischen Klone auch vergleichbare moderat starke Signale. Nur der Klon 6G wies ein etwas schwächeres Signal auf. Auch die beiden doppelt vorkommenden Klone zeigten in diesem Test vergleichbare Werte. Der neunmal vorkommende Klon 3G und der doppelt vorkommende Klon 3B, sowie vier einfach vorkommende Klone (2C, 3E, 6E und 11D) wurden zur weiteren Charakterisierung ausgewählt, da bei diesen das ELISA-Signal auf den SCLC-Membranfragmenten deutlich stärker war als auf den PBMC-Membranfragmenten (bei den übrigen Klonen war dieser Unterschied schwächer).

Nachdem die Stopp-Codons in den Sequenzen der untersuchten Phagen-Antikörper identifiziert waren, konnten spezifische Primer designed werden, die im Rahmen der ortsgerichteten Mutagenese (s. 4.2.7, S. 49) die Amber Stopp-Codons (TAG) durch Glutamin (CAG) ersetzen.

5.6 Transfektionseffizienz der HEK-Zellen

Nach Umklonierung der scFv in den pMS2-Vektor wurden die Plasmide in eukaryontische HEK-Zellen transfiziert. Um zu überprüfen, wie viele der HEK-Zellen den pMS2-Vektor durch Lipofektion aufgenommen hatten, wurde eine Messung im Durchflusszytometer durchgeführt. Die Zellen, die das Plasmid aufgenommen hatten, exprimierten das Reporterprotein GFP (grün fluoreszierendes Protein). Daher konnte die Transfektion anhand des grünen Fluoreszenz-Signals mit nicht-transfizierten Zellen verglichen werden. Insgesamt zeigte sich für alle sechs Klone eine Transfektionseffizienz von deutlich über 80 %.

Tabelle 11: Transfektionseffizienz der HEK-Zellen. Gezeigt ist die durchflusszytometrische Analyse der Transfektionseffizienz der HEK-Zellen. Als Negativkontrolle wurde die Analyse auch mit nicht-transfizierten HEK-Zellen durchgeführt. Für alle Klone zeigte sich eine Transfektiosneffizienz von über 80 %.

Probenname	Negativ (%)	Positiv (%)	Mediane grüne Fluoreszenzintensität
Nicht-transfizierte HEK-Zellen	98,23	1,77	3,17
2C	6,11	93,89	85,86
3B	8,05	91,95	52,18
3E	4,21	95,79	136,45
3G	7,64	92,36	45,87
6E	5,56	94,44	53,69
11D	16,32	83,68	70,61

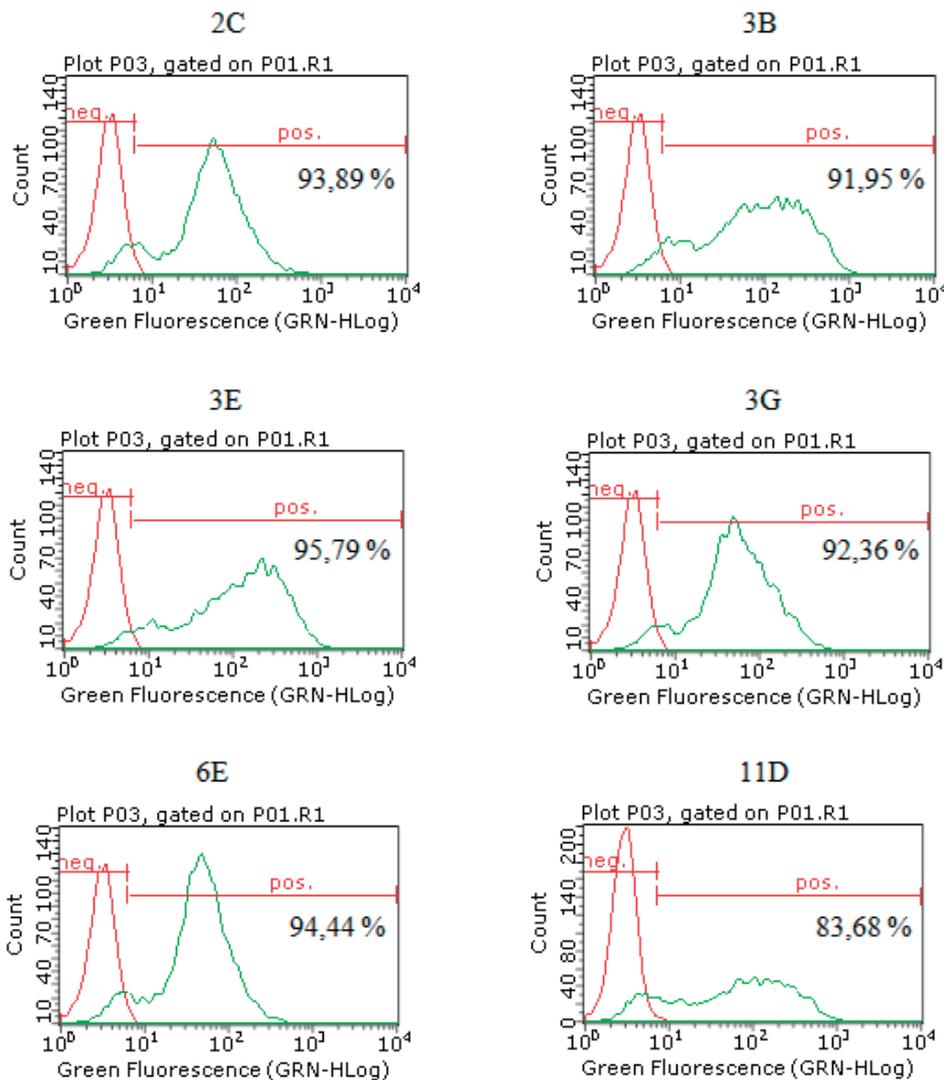


Abbildung 5: Durchflusszytometrische Analyse der Transfektionseffizienz der HEK-Zellen. Histogramme nach Analyse der Transfektionseffizienz für die sechs untersuchten Klone (2C bis 11D). Die Transfektionseffizienz der HEK-Zellen (grüner Graph) wurde dabei mithilfe des im Vektor enthaltenen GFP (grün-fluoreszierenden Proteins) bestimmt. Als Negativkontrolle wurden nicht-transfizierte HEK-Zellen (roter Graph) verwendet. Für alle untersuchten Klone zeigte sich eine Transfektionseffizienz von über 80 %.

5.7 Western Blot

Die Herstellung der scFv-Fc-Fusionsproteine wurde mit Hilfe eines Western Blots überprüft. Der spezifische Nachweis erfolgte hierbei über einen HRP-markierten anti-Maus Sekundärantikörper (siehe 4.2.11, S. 56). Zur Bestimmung der Proteingröße wurde ein Molekulargewichtsmarker aufgetragen. Im Western Blot wurden die Fusionsproteine mit dem berechneten Molekulargewicht von 57 kDa nachgewiesen. Lediglich der Antikörper 11D wies eine davon abweichende Molekülgröße auf.

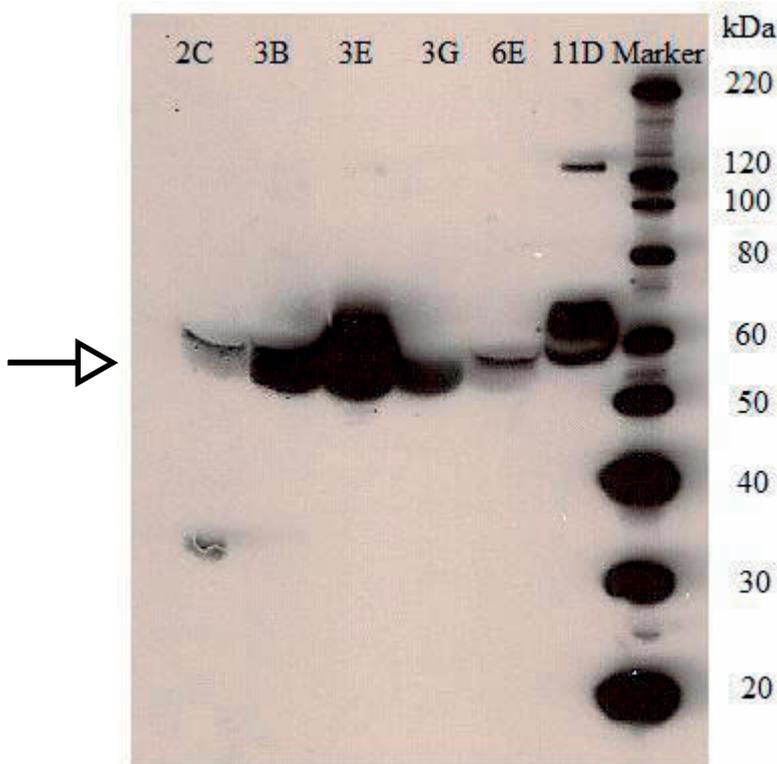


Abbildung 6: Western Blot der scFv-Fusionsproteine. Die eukaryotisch exprimierten Proteine wurden im Western Blot auf das Vorhandensein des scFv-Proteins getestet. Aufgetragen sind von links nach rechts die aus dem HEK-Zell-Überstand gewonnen scFv-Fragmente (2C bis 11D), sowie ein Proteinstandardmarker. Die gesuchte Proteinbande liegt bei ca. 57 kDa (Pfeil).

5.8 Coomassie-Färbung

In der durchgeführten Coomassie-Färbung (siehe 4.2.11, S. 56) konnte die Bande des hergestellten Proteins in den HEK-Überständen nicht eindeutig identifiziert werden, da im Gel mehrere dominante Banden dokumentiert wurden. Die Fusionsproteine wurden hier durch die im Medium enthaltenen Proteine überdeckt.

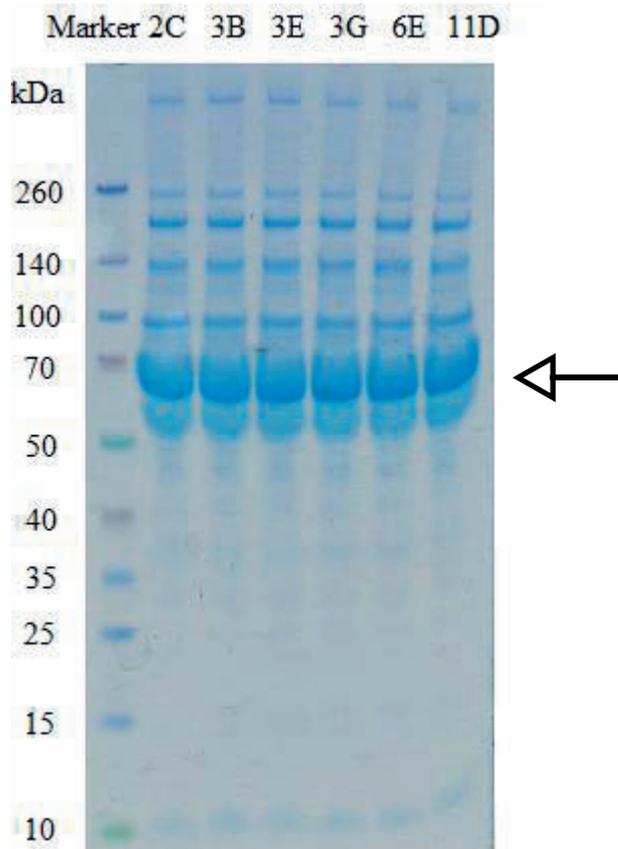


Abbildung 7: Coomassie-Färbung der HEK-Zellüberstände. Aufgetragen sind von links nach rechts ein Proteinstandardmarker, sowie die scFv-Fragmenten 2C bis 11D aus den HEK-Zell-Überständen. Da es sich um eine nicht aufgereinigte Lösung handelte, konnte die gesuchte Proteinbande nicht eindeutig identifiziert werden. Die erwartete Lage der gesuchten Proteinbande ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

5.9 Monoklonaler ELISA der scFv-Fusionsproteine auf der Zelllinie NCI-H82

Die Analyse der Bindeaktivität der in den HEK-Zell-Überstand sezernierten scFv-Fragmente erfolgte in zwei unabhängigen Versuchen. Die scFv-Fragmente wurden dazu im ELISA auf immobilisierten Membranfragmenten der Zelllinie NCI-H82 (SCLC) und der PBMC-Zellen, sowie auf BSA getestet (siehe auch 4.2.11, S. 56). Abbildung 8 zeigt die Absorptionswerte des ELISA als Mittelwerte. Als Kriterium für die spezifische Bindeaktivität diente dabei der Vergleich der mittleren Absorptionswerte der Klone auf den unterschiedlichen Antigenen. Dabei zeigten vier der sechs untersuchten Klone eine Bindeaktivität zu den NCI-H82-Membranfragmenten, während keine Bindeaktivität zu den Negativkontrollen PBMC-Membranfragmente und BSA gemessen wurde. Für die Klone 3B, 3E und 6E lag eine starke Bindung zu den SCLC-Membranfragmenten und ein deutlicher Unterschied zu den negativen Kontrollen vor. Die Bindung des Klons 2C

zu den SCLC-Membranfragmenten war im Vergleich dazu deutlich schwächer, jedoch immer noch dreifach größer als die Bindung zu den negativen Kontrollen. Die Klone 3G und 11D zeigten nahezu keine Bindung, weder zu den SCLC-Membranfragmenten, noch zu den negativen Kontrollen.

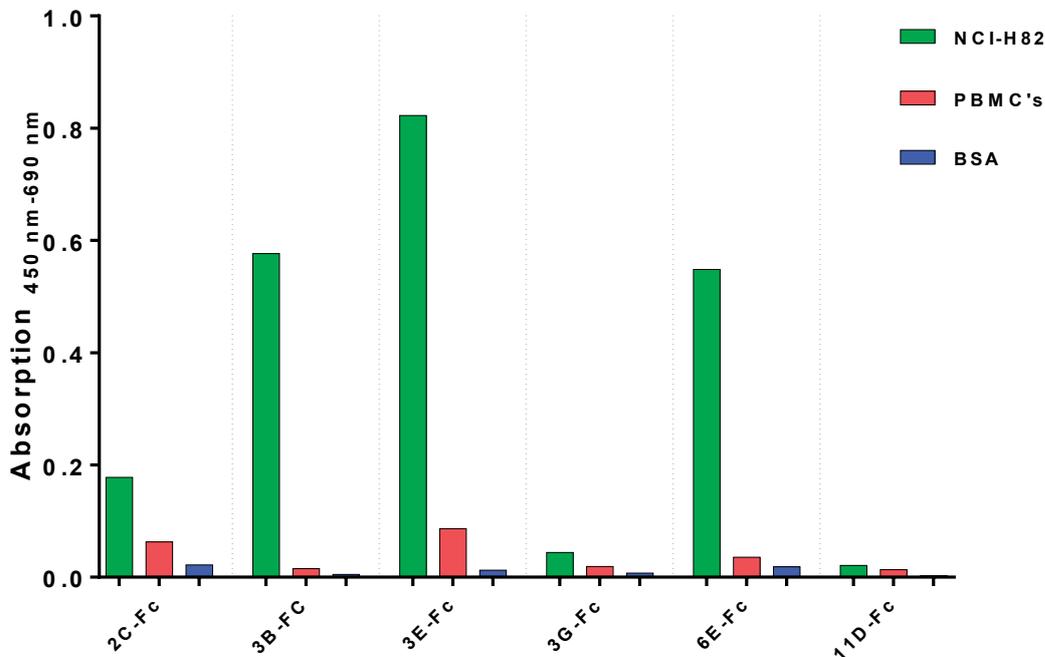


Abbildung 8: Analyse der Bindeaktivität der SCLC-spezifischen scFv-Fusionsproteine im ELISA. Die Bindeaktivität der löslichen scFv-Fragmente wurde auf Membranfragmenten der SCLC-Zelllinie NCI-H82 (grün) und peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC's, rot), sowie auf bovinem Serumalbumin als irrelevantem Protein (BSA, blau) getestet. Dargestellt sind die Daten zweier unabhängiger Experimente als Mittelwert. [Messung bei 450 nm (Referenzwellenlänge: 690 nm); GraphPad Prism 6-Software].

Da hier für den Klon 11D die schwächste Bindeaktivität gemessen wurde und das Western Blot-Ergebnis ein unerwartetes Molekulargewicht zeigte, wurde dieser für die abschließende Durchflusszytometrie nicht mehr verwendet. Auch die Transfektionseffizienz war bei Verwendung von 11D am schlechtesten.

5.10 Überprüfung der Bindeaktivität der scFv-Fc-Fusionsproteine mittels Durchflusszytometrie

In der Durchflusszytometrie wurde die spezifische Bindung der scFv-Maus-Fc-Fusionsproteine zu vitalen Zellen getestet. Dazu wurden die SCLC-Zelllinien NCI-H82, NCI-H69 und DMS 273, sowie als Negativkontrolle PBMC's mit den Fc-

Fusionsproteinen 2C, 3B, 3E, 3G und 6E inkubiert. Die Detektion erfolgte mit einem Goat anti-mouse FITC (gamFITC) Sekundärantikörper, durch dessen Fluorochrom bei Bindung eine Verschiebung des grünen Fluoreszenzsignals gemessen werden konnte. Außerdem wurden alle Zelllinien auch mit Zellkulturüberstand von nicht-transfizierten HEK-Zellen gefärbt, um so das Hintergrundsignal des Mediums und des Sekundärantikörpers gamFITC zu ermitteln (siehe 4.2.11, S. 56).

Die Zellen, die von einem scFv-Fc-Fusionsprotein erkannt wurden, zeigten nach Zugabe des Sekundärantikörpers eine Verschiebung des Fluoreszenzsignals. Zur Auswertung wurden diese Signale mit den Hintergrundsignalen in Relation gesetzt.

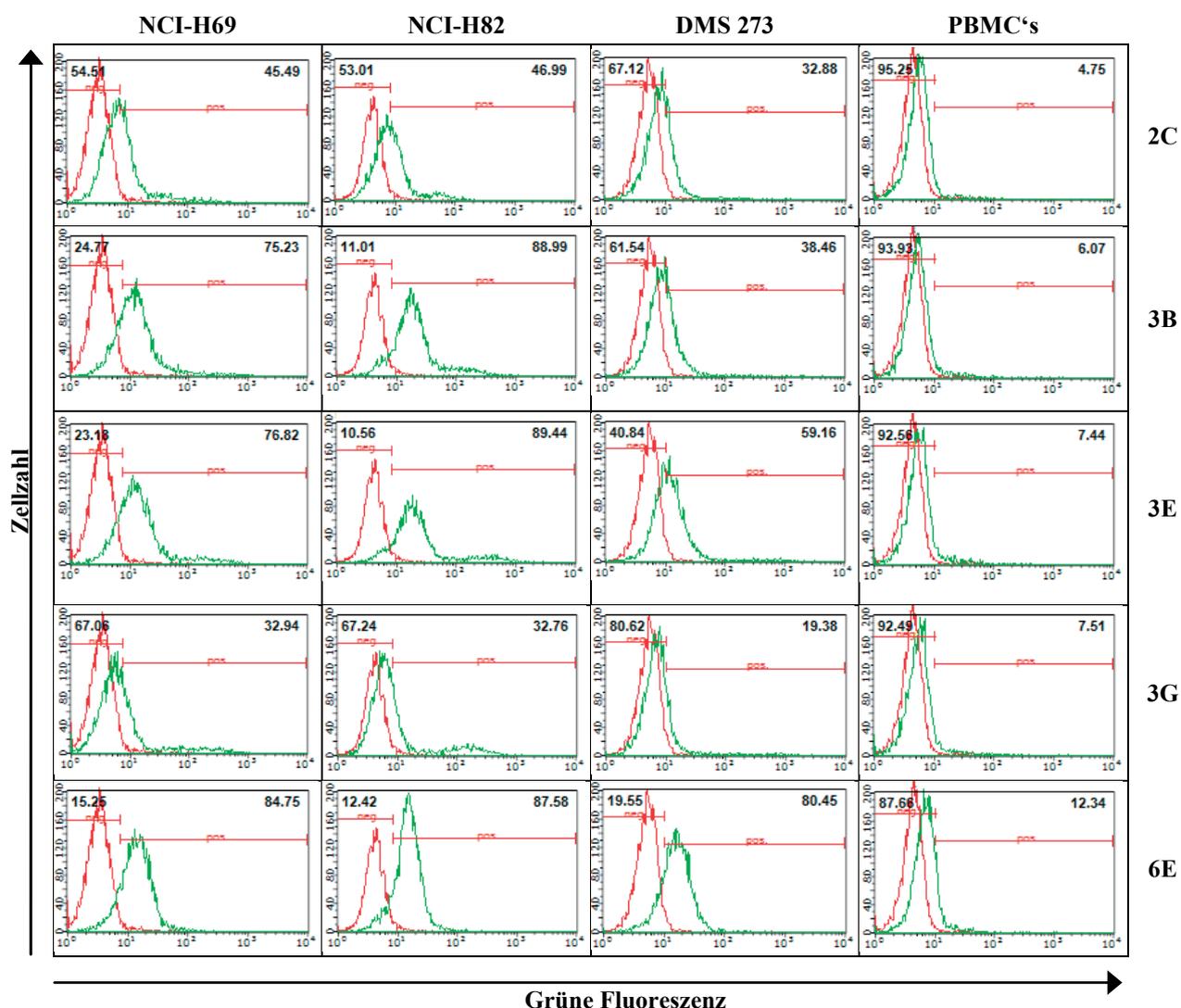


Abbildung 9: Histogramme der Bindeaktivität der SCLC-spezifischen scFv-Fusionsproteine in der Durchflusszytometrie. Bei den Histogrammen ist die grüne Fluoreszenzintensität gegen die Zellzahl aufgetragen. Der grüne Graph zeigt dabei das Signal der Zellen, die mit scFc-Fc-Fusionsprotein enthaltenden Überstand der HEK-Zellen inkubiert wurden. Der rote Graph zeigt im Vergleich dazu das Signal der Zellen mit Überstand von nicht-transfizierten HEK-Zellen (Hintergrundsignal). Die Fusionsproteine 3B, 3E und 6E zeigen dabei eine starke Bindung zu den drei untersuchten SCLC-Zelllinien (NCI-H82, NCI-H69, DMS 273), bei 2C und 3G wurde nur eine schwache Bindung nachgewiesen. Des Weiteren wurde bei keinem der Fusionsproteine eine Bindung zu PBMC-Zellen (Negativzellen) detektiert.

In Abbildung 10 sind die Ergebnisse aus den durchflusszytometrischen Untersuchungen als Balkendiagramm zusammengefasst. Anhand der Fluoreszenzverschiebung wurden die scFv-Fc-Fusionsproteine in schwache (Verschiebung 20-40 %), moderate (Verschiebung 40-60 %) und starke Binder (Verschiebung >60 %) eingeteilt. Für die Fusionsproteine 3E und 6E konnte dabei auf allen SCLC-Zelllinien eine starke Bindung nachgewiesen werden. Der Klon 3B zeigte ebenfalls eine starke Bindung zu den SCLC-Zelllinien NCI-H82 und NCI-H69, jedoch nur eine moderate Bindung zu der Zelllinie DMS 273. Für die Klone 2C und 3G wurden nur moderate Bindungen zu den SCLC-Zelllinien gemessen. Eine Bindung zu den PBMC-Zellen wurde für kein Fusionsprotein detektiert, was insgesamt für die SCLC-Spezifität der Antikörper spricht.

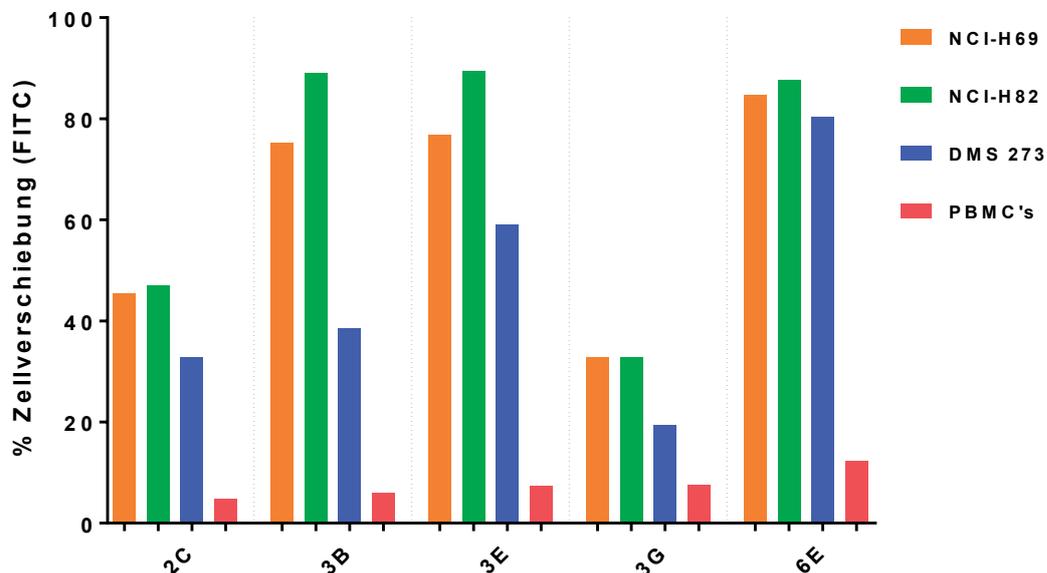


Abbildung 10: Analyse der Bindeaktivität der SCLC-spezifischen scFv-Fusionsproteine in der Durchflusszytometrie. Die Bindeaktivität der löslichen scFv-Fragmente wurde auf vitalen Zellen der Zelllinien NCI-H69 (orange), NCI-H82 (grün), DMS 273 (blau) und peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC's=Negativzellen, rot) getestet. Für die scFv-Fc-Fusionsproteine 3B, 3E und 6E wurde dabei eine starke, für 2C und 3G nur eine moderate Bindung zu den SCLC-Zelllinien detektiert. Zu den PBMC-Zellen zeigte keiner der Klone eine Bindungsaktivität. [GraphPad Prism 6-Software].

6 Diskussion

Mit einer geschätzten Inzidenz von 410.000 Neuerkrankungen pro Jahr in Europa gehört das Bronchialkarzinom nicht nur zu den am häufigsten diagnostizierten Krebserkrankungen, es ist auch für 21 % der Krebstodesfälle verantwortlich [1]. Besonders das kleinzellige Bronchialkarzinom zeichnet sich durch einen aggressiven klinischen Verlauf [50] und frühzeitige Metastasierung aus [7], weshalb es eine hohe Todesrate innerhalb von einem Jahr nach Diagnosestellung zeigt [6]. Bisher stellten Operationen, sowie Radio- und Chemotherapieverfahren je nach Stadium die Standardtherapie der Bronchialkarzinome dar. Neuere Therapieverfahren zur Behandlung der nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinome sind zudem die Gabe von monoklonalen Antikörpern oder Tyrosin-Kinase-Inhibitoren [20, 21, 22, 33]. Für einige dieser Substanzen wurde bereits eine verlängerte Überlebenszeit nachgewiesen [31, 33]. Teilweise ist der klinische Benefit der Substanzen jedoch an spezifische Veränderungen des Tumor-Zell-Genoms geknüpft. Des Weiteren treten bei den bisher getesteten Medikamenten auch Resistenzen auf [35]. Auch bei erfolgreicher Primärtherapie können einige so genannte „Krebsstammzellen“ überleben, die enorme Fähigkeiten zur Selbsterneuerung und Regeneration besitzen [15]. Wenn diese Krebsstammzellen vorhanden sind, spricht man auch von einer minimalen Resterkrankung, deren Vorhandensein einen großen Risikofaktor für Rezidive darstellt [15]. Die Krebsstammzellen sind als therapeutisches Ziel in den Fokus gerückt, um Rezidive zu verzögern oder zu verhindern [15]. Neue Tumorthérapien, die auf der Verwendung von spezifischen monoklonalen Antikörpern basieren, könnten bei Patienten mit bisher therapieresistenter Erkrankung eine Alternative zur klassischen Chemotherapie bieten und das Rückfall-freie-Überleben deutlich verlängern [17].

6.1 Verwendung der Phage-Display-Technologie

Um die Immunogenität von therapeutischen Antikörpern zu minimieren und die therapeutische Effizienz zu erhöhen, wird inzwischen vermehrt auf humane oder humanisierte Antikörper gesetzt, statt auf solche murinen oder chimären Ursprungs [55,

59]. Zur Herstellung komplett humaner Antikörper kann im Rahmen der Xenomaus-Technologie (siehe 1.2.1, S. 12) auf transgene Mäuse zurückgegriffen werden. Dazu werden beispielsweise künstlich hergestellte Hefe-Chromosomen, die humane Immunglobulin-Gen-Loci tragen, in murine embryonale Stammzellen eingebracht und die Produktion muriner Antikörperketten unterdrückt [100]. Ein weiteres modernes Herstellungsverfahren für humane Antikörper ist die Phage-Display-Technologie (siehe 1.3, S. 18). Die Methode basiert auf der Expression von funktionellen Antikörperfragmenten auf der Oberfläche von Bakteriophagen, die dann anhand ihres Antigen-Bindungsverhalten isoliert werden können [70]. Ein Vorteil der Phage-Display-Technologie ist eine schnellere Identifizierung des Antikörpers, da diese Technik ohne die zeitaufwändige Immunisierung von Tieren auskommt. Mit dieser Technologie können Binder mit hoher Spezifität und Affinität gewonnen werden. Bei Bedarf können diese gewonnenen Binder im Anschluss in einer *in-vitro*-Affinitätsreifung noch weiter verbessert werden [101].

6.2 Selektion auf FFPE-Gewebe und Antikörperdemaskierung

Klassische Selektionsstrategien basieren auf der Verwendung von aufgereinigten Proteinen oder kultivierten Zellen [76]. Selektionsmethoden für humane Gewebe sind jedoch nur selten beschrieben. Die natürliche Umgebung der Zellen und die extrazelluläre Matrix spielen jedoch eine wichtige Rolle in der Regulation der Genexpression. Somit ist eine Selektion der tumorspezifischen Antikörper in der natürlichen Umgebung der Zelle anzustreben [76]. In dieser Arbeit fanden die Selektionsrunden für die Phage-Display-Technologie auf Formalin-fixiertem und Paraffin-eingebetteten Geweben (FFPE-Geweben) und somit auf komplexen Antigenstrukturen statt. FFPE-Gewebe wird in der pathologischen Diagnostik standardmäßig zur Konservierung und Aufbereitung von Gewebeproben für Histologie und Immunhistochemie verwendet und ist bei Raumtemperatur über Jahre stabil [82]. Da diese Biopsien routinemäßig für die Diagnostik durchgeführt werden, kommt die Verwendung des FFPE-Gewebes ohne zusätzliche Belastung für den Patienten aus.

Durch eine Vernetzungsreaktion mit Formalin kommt es während der Fixierung zu einer „Maskierung“ der Antigene, wodurch diese zum Teil nicht von Antikörpern erkannt werden können [102]. Um diese Reaktion in großen Teilen rückgängig zu machen, werden Methoden zur Antigendemaskierung benötigt. Die eingesetzte Methode ist abhängig vom gesuchten Antigen [102]. Da in dieser Arbeit vor den Selektionen nicht bekannt war, gegen welches Antigen sich ein später gefundener Antikörper richten könnte, wurden verschiedene Demaskierungsmethoden im Sinne eines „heat induced epitope retrieval“ (HIER) bzw. „proteolytic induced epitope retrieval“ (PIER) angewendet (siehe 4.2.2, S. 42). In den bisher durchgeführten Versuchen von Phage-Display-Selektionen auf FFPE-Gewebe wurde überwiegend auf eine solche Antigendemaskierung verzichtet (vgl. dazu auch 1.3.1, S.20). Nach der Elution wurden die Phagen der mit unterschiedlichen Demaskierungsverfahren behandelten Schnitte wieder zusammengeführt, sodass das effektivste Demaskierungsverfahren hier nicht bestimmt wurde.

Einige wenige Arbeiten zur erfolgreichen Selektion von spezifischen Antikörpern auf Patientenmaterial sind bereits beschrieben. Jedoch wurden in diesen Arbeiten überwiegend gefrorene Biopsate [77, 78, 79] oder in Formalin-fixierte und in Paraffin-eingebettete Zelllinien [81], sowie in Lösung schwimmende Schnitte [82] verwendet. In dieser Arbeit wurden jedoch immobilisierte FFPE-Gewebeschnitte verwendet. In einigen Arbeiten, in denen ebenfalls die Selektion auf FFPE-Gewebe versucht wurde, wurde das Gewebe vor der Selektion mithilfe der Laser-Mikrodissektion bearbeitet und gesunde Gewebeteile abgetragen, um nach Möglichkeit reines Tumorgewebe zu erhalten. Nach der Bindung an das so vorbehandelte Gewebe, zeigte sich jedoch ein großer Verlust von Phagen, möglicherweise aufgrund einer Austrocknung der Gewebe während der Laser-Mikrodissektion [81]. Des Weiteren schienen die Phagen zum Teil ihre Fähigkeit zur Infektion der Bakterien verloren zu haben [77]. In Anbetracht dieser Ergebnisse und des hohen Aufwandes wurde in dieser Arbeit auf eine Laser-Mikrodissektion verzichtet. Stattdessen wurden die Gewebeschnitte von einem erfahrenen Pathologen begutachtet und solche Schnitte ausgewählt, die nahezu ausschließlich aus entartetem Gewebe bestanden. Auch wenn die hier verwendeten SCLC-Gewebeproben lichtmikroskopisch zum größten Teil aus Tumorzellen bestanden, bleibt ein Problem: Unabhängig von Tumortyp, Tumormasse oder Vorbehandlung des Gewebes besteht nahezu immer eine Kontamination mit stromalen, epithelialen oder

inflammatorischen Zellen [103]. Um zu verhindern, dass Antikörper auch gegen gesundes Gewebe selektiert werden, wurde in dieser Arbeit vor jeder Selektionsrunde eine Depletion auf nicht-tumorösem Lungengewebe durchgeführt. In der Arbeit von Jarutat *et al.* wurde auf eine solche Depletion vor der ersten Selektionsrunde verzichtet, was möglicherweise dazu geführt haben könnte, dass die selektierten Phagen sich vor allem gegen Antigene richteten, die auch von gesunden Zellen exprimiert wurden. Dadurch könnten einige tumorspezifische Antikörper nicht stark genug selektiert worden und somit im Verlauf untergegangen sein [82].

In dieser Arbeit wurden die Phagen während der Depletionen auf das FFPE-Gewebe (nicht-tumoröses Lungengewebe) aufgebracht, um kreuzreagierende Klone möglichst frühzeitig zu entfernen. Daran schlossen sich die Selektionsrunden an, deren Ziel es war SCLC-spezifische Bindungen zu provozieren und schwache oder nicht-bindende Klone zu entfernen. In dieser Arbeit wurden drei Selektionsrunden durchgeführt. Zu wenige Selektionsrunden bergen das Risiko, dass sich nicht genügend spezifisch-bindende Klone durchsetzen [104], wohingegen zu viele Selektionsrunden das Wachstum von mutierten scFv-Klonen begünstigen können, da diese in *E.coli* einen Wachstumsvorteil haben [105]. Aber nicht nur die Anzahl der Depletions- und Selektionsrunden, sondern auch die Waschbedingungen und die Rückgewinnung spezifisch gebundener Phagen haben Einfluss auf den Erfolg der Selektion [87]. Daher galt es in diesem Versuch ebenso die Waschstringenz hoch zu halten. Als Waschpuffer wurde in dieser Arbeit PBST (PBS mit 0,05 % Polysorbat 20 (Tween 20)) verwendet. Tween 20 ist ein nicht-ionisches Tensid, welches durch solubilisieren von Zellmembranen in der Lage ist, Zellen zu lysieren [106]. In geringerer Konzentration wird es aber als Standardwaschpuffer während des „Pannings“ eingesetzt, um unspezifische Bindungen zu lösen.

6.3 Anreicherungsfaktor der scFv-Phagen auf FFPE-Gewebe

Die Phagenbibliotheken I und J wurden in drei aufeinander folgenden Selektionsrunden auf SCLC-Gewebe eingesetzt, um spezifische Antikörperfragmente zu generieren. Im Verlauf der Selektionsrunden wurden die Waschstringenz und somit auch der Selektionsdruck erhöht (siehe 4.2.2, S. 42). Nach jeder Runde wurden die

antigenbindenden Phagen eluiert und ihre Konzentration titriert. Sowohl für die Phagenbibliothek I, als auch für die Phagenbibliothek J zeigte sich nach jeder Runde eine deutliche Abnahme des Verhältnisses von Output- zu Input-Titer von Runde zu Runde (vgl. dazu Tabelle 4 und Tabelle 5, S. 61). In der Literatur sind ebenfalls Studien zu finden, bei denen es nicht zu einem Anstieg des Titerverhältnisses kam, aber dennoch positive Klone gefunden wurden [107]. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die Komplexität der Antigenstrukturen sein, auf denen hier selektioniert wurde. In vielen herkömmlichen Studien, die eine steigende Anreicherung zeigen, wurde auf isolierten Antigenen selektioniert und nicht auf ganzen Geweben [93]. Zudem hängt der Anstieg der Titerverhältnisse auch von der Waschstringenz ab [107]. Des Weiteren führten wir vor jeder Selektionsrunde eine Depletion auf gesundem Lungengewebe durch, wodurch zwar unspezifische Binder eliminiert werden sollten, es jedoch auch zu einem Absinken des Output-Titers gekommen sein könnte. Die Verwendung komplexer Antigenstrukturen bietet jedoch auch einen entscheidenden Vorteil: Je komplexer eine Antigenstruktur, desto höher ist deren Immunogenität [108]. Daher sind bei komplexen Antigenstrukturen auch kleine Mengen des Zielantigens ausreichend, um eine Antikörperbindung zu ermöglichen.

6.4 Anreicherung SCLC-spezifischer Phagen-Antikörper in der polyklonalen Durchflusszytometrie

Nach den drei Selektionsrunden wurde die Bindeaktivität der gewonnenen polyklonalen Phagensuspensionen aus den Antikörper-Bibliotheken I und J auf der SCLC-Zelllinie NCI-H82 in einer Durchflusszytometrie getestet (vgl.: 5.2, S. 61). Ein Anstieg des Fluoreszenzsignals zeigte dabei eine höhere Anzahl bindender Phagenpartikel an.

Es zeigt sich, dass die Bindeaktivitäten der Selektionsfraktionen beider Antikörperbibliotheken nach der Selektion deutlich höher lagen, als bei Verwendung der Original-Bibliothek (I von 6 % auf 22 %; J von 6 % auf 14 %). Der Abfall der Bindeaktivität nach der ersten Selektionsrunde bei der Antikörperbibliothek J und nach der zweiten Selektionsrunde bei Antikörperbibliothek I lässt sich möglicherweise durch die strengere Waschstringenz erklären, sodass zwar insgesamt weniger, aber dafür spezifischere Binder vorhanden waren.

Um zu überprüfen, ob die Bindeaktivität auch auf den anderen SCLC-Zelllinien nachweisbar war, wurden in einem weiteren Test die Original-Bibliotheken I und J gegen deren jeweilige 3. Selektionsfraktion auf den drei SCLC-Zelllinien (NCI-H82, NCI-H69, DMS 273), sowie als Negativkontrolle auf PBMC-Zellen getestet. Auf allen drei SCLC-Zelllinien zeigte sich ein Anstieg des Fluoreszenzsignals und somit ein Anstieg an SCLC-spezifischen Antikörpern im Phagenpool nach der dritten Selektionsrunde im Vergleich zur jeweiligen Originalbibliothek (vgl. S. 66ff.). Dieser Anstieg war auf allen Zelllinien bei der Antikörper-Bibliothek J größer als bei I. Unter anderem deshalb wurden die weiteren Versuche nur mit der Antikörper-Bibliothek J durchgeführt. Bei den PBMC-Zellen zeigte sich nur ein minimaler Anstieg des Anteils an von Antikörpern erkannten Zellen nach der dritten Selektionsrunde im Vergleich zu den Original-Bibliotheken. Dieser Anstieg war jedoch deutlich geringer, als bei den SCLC-Zelllinien, sodass von einer spezifischen Bindeaktivität ausgegangen werden konnte.

6.5 Monoklonaler ELISA auf Phagenebene

Um die spezifische Bindeaktivität einzelner Klone zu überprüfen, wurden von den angereicherten Phagen-Bibliotheken I und J zunächst jeweils 88 Klone auf der SCLC-Zelllinie NCI-H82 untersucht (vgl. 5.3, S. 67). Dabei zeigten die Klone aus der Phagen-Bibliothek I lediglich schwache Bindungen, wohingegen sich bei Verwendung der Phagen-Bibliothek J auch moderate bis starke Bindungen zeigten, sodass im weiteren Verlauf mit der Phagen-Bibliothek J weiter gearbeitet wurde. Von dieser wurden dann noch zwei weitere sogenannte Masterplatten erstellt. Von diesen drei Masterplatten wurden dann insgesamt 264 Klone untersucht, von denen 78 eine Bindung zeigten (darunter 16 starke Bindungen). Von diesen positiv getesteten Klonen wurden 18 ausgewählt (darunter zwölf starke, vier moderate und zwei schwache Binder) und in einem weiteren Versuch neben NCI-H82 Membranfragmenten auch auf BSA als irrelevantem Protein und auf Membranfragmenten von PBMC-Zellen getestet, um eine unspezifische Bindeaktivität auszuschließen (vgl. 5.4, S. 68). Für neun der Binder wurde ein moderates Signal gemessen, die Übrigen wiesen ein schwaches Signal auf. Bei allen Bindern waren die auf den SCLC-Membranfragmenten gemessenen Signale

deutlich höher als auf BSA oder PBMC-Membranfragmenten, was für die Spezifität der Bindung spricht.

6.6 Sequenzierung

Bei der Sequenzierung (vgl. 5.5 S. 70) der Klone zeigte sich, dass neun der 18 untersuchten Klone identisch waren. Diese neun identischen Klone wiesen mit einer Ausnahme vergleichbar starke Signale im vorangegangenen ELISA auf, lediglich der Klon 6G zeigte dort nur ein schwaches Signal. Ein mögliche Ursache hierfür könnte ein anderes Wachstumsverhalten der Bakterien in diesem Well der Masterplatte und somit ein niedrigerer Phagentiter sein. Ein Klon kam doppelt vor und zeigte ebenfalls im vorangegangenen ELISA vergleichbare Werte. Für den weiteren Verlauf wurden der neunmal vorkommende Klon (3G), der doppelt vorkommende Klon (3B) und vier einfach vorkommende Klone (2C, 3E, 6E und 11D) ausgewählt, da bei diesen das ELISA-Signal auf den SCLC-Membranfragmenten deutlich stärker war, als auf den PBMC-Membranfragmenten.

6.7 Monoklonaler ELISA der scFv-Fusionsproteine auf der Zelllinie NCI-H82

Die produzierten scFv-Fc-Fusionsproteine wurden auf Membranfragmenten der Zelllinie NCI-H82 (SCLC) und der PBMC's, sowie auf BSA getestet. Abbildung 8 (s. S. 75) zeigt die Ergebnisse dieses monoklonalen ELISAs. Dabei zeigten vier der untersuchten Klone eine hohe Bindeaktivität zu den NCI-H82-Membranfragmenten und nahezu keine Bindung zu den PBMC-Membranfragmenten oder zu BSA. Die Klone 3G und 11D zeigten keine Bindung, obwohl beide in den ELISAs auf Phagenebene zu den stärksten Bindern gehörten. Dieses Phänomen wurde in der Literatur bereits beschrieben [107, 109]. Der genaue Grund dafür, dass die Bindung bei Verwendung von scFv-Fragmenten nicht bestätigt werden kann, ist jedoch noch unbekannt [109]. Das Haupthüllprotein pVIII, gegen das sich der im Phagen-ELISA verwendete Antikörper anti-M13 richtet, kommt ca. 2.700 mal auf der Phagenoberfläche vor [110]. Dadurch

kam es zu einer Verstärkung des Absorptionssignals. Im Gegensatz dazu wurde bei der Testung der Fusionsproteine ein Sekundärantikörper verwendet, der sich gegen den Fc-Teil richtet, der pro Antikörper nur einmal vorkommt. Dies könnte einer der Gründe für die Messung eines höheren Absorptionssignals auf Phagenebene sein [109]. Ein anderer möglicher Grund könnte die geringere Löslichkeit der scFvs ohne Phagen sein [107].

Da der Klon 11 D keine Bindung zeigte und im Western Blot (s. S. 72) eine unerwartete Molekülgröße aufwies, musste davon ausgegangen werden, dass die Produktion dieses Antikörpers fehlerhaft war. Daher wurde dieser in der abschließenden Durchflusszytometrie nicht mehr verwendet.

6.8 Antikörper-Durchflusszytometrie auf den Zelllinien

In der Durchflusszytometrie konnte die spezifische Bindung der scFv-Maus-Fc-Fusionsproteine auch auf vitalen Zellen bestätigt werden. Während des Phage-Display-Verfahrens auf Gewebeschnitten ist nicht beeinflussbar, ob Antikörper gegen Oberflächenstrukturen oder intrazelluläre Antigene gewonnen werden. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie konnte dies überprüft werden, da nur Bindungen an Oberflächenantigene der vitalen Zellen erfasst wurden. Dazu wurden jeweils Antikörper aus den Klonen 2C, 3B, 3E, 3G und 6E auf die SCLC-Zelllinien NCI-H82, NCI-H69 und DMS 273, sowie als Negativkontrolle auf PBMC-Zellen gegeben (für die Ergebnisse der Durchflusszytometrie siehe auch 5.10, S. 75).

Das Hintergrundsignal des Sekundärantikörpers gamFITC betrug für alle SCLC-Zelllinien 3-4 %. Auf allen drei Zelllinien zeigten fast alle untersuchten scFv-Fusionsproteine einen Anteil fluoreszierender Zellen von 30-90 %, was deutlich über dem Hintergrundsignal lag. Die höchsten Fluoreszenzsignale wurden auf allen SCLC-Zelllinien für die Klone 3B, 3E und 6E gemessen. Bei Testung auf PBMC-Zellen konnte für die untersuchten scFv-Fusionsproteine nur eine vernachlässigbar geringe Bindeaktivität dokumentiert werden. Damit wurden die PBMC-Zellen von den produzierten scFv-Fusionsproteinen im Vergleich zu den SCLC Zellen deutlich seltener erkannt und gebunden, was für die Spezifität der Antikörper spricht (vgl. hierzu auch Abbildung 10, S. 77).

Da die Durchflusszytometrie mit ganzen, vitalen Zellen durchgeführt wurde, bestätigte sich hier zudem, dass die scFv-Fusionsproteine gegen Oberflächenantigene und nicht gegen intrazelluläre Strukturen gerichtet waren, was für die mögliche spätere Verwendung als diagnostische oder therapeutische Antikörper einen entscheidenden Vorteil mit sich bringt.

6.9 Ausblick – Anwendung von antikörperbasierten Therapeutika

Die scFv-Fragmente bestehen aus den Antigen erkennenden variablen Domänen der leichten und schweren Kette eines klassischen Antikörpers. Diese beiden Domänen sind durch einen kurzen Linker verbunden [112, 74, 111]. Die kleineren rekombinanten Antikörper-Fragmente (wie beispielsweise die scFv) stellen vielversprechende Alternativen zu klassischen Antikörpern da, die auch in einer Übersichtsarbeit von Ahmad *et al.* [111] hervorgehoben wurden. Neben einer ökonomischeren Produktion ist ein weiterer Vorteil der Antikörper-Fragmente, dass sie die gleiche spezifische Affinität zum Ziel-Antigen aufweisen, wie der Vollängenantikörper von dem sie abgeleitet sind, dabei aber über verbesserte pharmakokinetische Eigenschaften zur Gewebe-Penetration verfügen [112, 111]. Eine reduzierte Immunogenität und eine kürzere Halbwertszeit in Nicht-Zielgeweben stellen weitere Vorteile gegenüber den „klassischen“ Antikörpern dar [111]. Die Verwendung der Phage-Display-Technologie bietet dabei den Vorteil, hochaffine Antikörperfragmente aus einer großen Anzahl unspezifischer Binder heraus zu selektionieren [111]. Meist werden die Selektionsrunden beim Phage-Display auf aufgereinigten Antigenen durchgeführt. Wenn aber, wie beispielsweise in dieser Arbeit, Antikörperfragmente gegen unbekannte Antigene selektioniert werden sollen, sind Selektionen auf komplexen Antigenquellen, wie beispielsweise Gewebeschnitten, nötig [111].

Eine Konversion der scFv-Fragmente in andere Antikörperformate, wie beispielsweise Fab-Fragmente ist prinzipiell ebenfalls möglich [113]. Jedoch ist dabei zu beachten, dass die Konversion die Bindungseigenschaften des Antikörperfragments beeinflussen kann [113].

Als bifunktionale Proteine eingesetzte scFv-Fragmente, die sowohl über Antigen-Bindungsstellen, als auch über eine Markeraktivität verfügen, könnten die Immunodetektion in nur einem Schritt auf Patientengewebeschnitten ermöglichen [111]. Ein zukünftiges Ziel wird es zudem sein, die Verwendung der Antikörperfragmente in Kombination mit Immuntoxinen, Medikamenten oder Radionukliden *in vitro* und *in vivo* zu testen, um das mögliche therapeutische Potential dieser Antikörper zu erforschen [55, 111].

Ein Beispiel für ein bereits zugelassenes Antikörper-Wirkstoff-Konjugat ist Brentuximab Vedotin in der Behandlung von Hodgkin-Lymphomen und anaplastisch-großzelligen Lymphomen [114]. Dabei wurde der CD30-Antikörper über einen abspaltbaren Enzym-Linker an das Zytostatikum Monomethyl Auristan E gekoppelt. Eine Tumorregression konnte in einer Studie bei 86 % der Patienten gezeigt werden; bei 81 % der Patienten, die unter Tumor-assoziierten Symptomen litten, konnten diese deutlich gemindert werden [114]. Jedoch kam es auch zu typischen Nebenwirkungen des Zytostatikums, wie Fatigue, Übelkeit, Erbrechen und Polyneuropathien [114].

Die in der Vergangenheit verwendeten Antikörper-Wirkstoff-Konjugate bestanden in der Mehrzahl der Fälle aus Kombinationen von humanisierten oder humanen Antigen-Bindungsstellen mit pflanzlichen oder bakteriellen Toxinen [115, 116]. Diese nicht-humanen Toxine erzeugten jedoch unerwünschte Immunreaktionen, was Dosis-Limitationen nach sich zog [115, 116, 117, 118]. Deshalb gibt es immer mehr Bestrebungen nicht-humane Toxine durch pro-apoptische humane Enzyme zu ersetzen [115, 116], um so vollständig humane zielgerichtete Biopharmazeutika zu erzeugen.

Bevor die Antikörper jedoch zur Diagnostik oder Therapie maligner Erkrankungen verwendet werden können, ist die Identifizierung der Antigene notwendig, gegen die die selektierten Antikörper gerichtet sind. Eine Möglichkeit zur Identifizierung der jeweiligen Antigene stellt die Immunpräzipitation mit anschließendem Western Blot und Massenspektroskopie dar [82, 115]. Dabei wird der verwendete Antikörper mit dem gebundenen Antigen an eine Matrix (z. B. Agarosepartikel) gekoppelt. Dieser relativ große Komplex kann nun durch Zentrifugation von anderen Proteinen des SCLC-Zelllysats abgetrennt und auf ein SDS-Gel aufgetragen werden [115]. Durch einen Western Blot mit anschließender Massenspektroskopie und Abgleich mit

Proteindatenbanken können dann die Antigene identifiziert werden [82]. Dieses Verfahren soll nun in der Arbeitsgruppe etabliert werden. Ist dies erfolgreich könnte zum einen versucht werden, die Antikörper in der immunhistochemischen Diagnostik zu etablieren. Zum anderen könnte auch die Verwendung der Antikörper als Immunotoxin getestet werden. Dabei soll zunächst *in vitro* die zytotoxische Effektivität gegenüber SCLC-Zellen untersucht werden. Um dann *in vivo* die Verträglichkeit und Bioverfügbarkeit der Immunotoxine zu testen, soll ein orthotopes Xenograft Mausmodell verwendet werden.

7 Zusammenfassung

Das kleinzellige Bronchialkarzinom (SCLC) metastasiert früh und ist durch einen aggressiven Verlauf gekennzeichnet, der mit 2-Jahres-Überlebensraten von unter fünf Prozent einhergeht. In der Therapie von malignen Erkrankung werden immer häufiger monoklonale Antikörper als spezifische Therapeutika verwendet. Beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom konnten damit schon vielversprechende Erfolge erzielt werden, die bisher beim SCLC jedoch nicht bestätigt werden konnten. Ein effektives *in vitro* Herstellungsverfahren für diese Antikörper ist die in dieser Arbeit verwendete Phage-Display-Technologie. Die Methode basiert auf der Expression von funktionellen Antikörperfragmenten auf der Oberfläche von Bakteriophagen, die dann anhand ihres Antigen-Bindungsverhalten isoliert werden können. Für Standardselektionsverfahren werden Zelllinien oder aufgereinigte Antigene verwendet, bei denen die Antigene jedoch nicht in ihrer natürlichen Umgebung vorliegen. In dieser Arbeit fanden die Selektionen auf FFPE-Gewebeschnitten, also auf komplexen Antigenstrukturen in ihrer natürlichen Umgebung statt. Da es sich hier um Material handelt, dass im Rahmen einer Routinediagnostik gewonnen wurde, kam es nicht zu einer zusätzlichen Belastung für den Patienten. Zunächst wurden verschiedene Antigendemaskierungsverfahren angewendet, um die Zugänglichkeit und damit die Immunogenität der Epitope zu erhöhen. Dann wurde mit den scFv-Antikörper-Bibliotheken Tomlinson I und J zunächst auf gesundem Lungengewebe depletiert, um tumorirrelevante Antikörper zu entfernen, bevor sie zur Selektion auf SCLC-Gewebe gegeben wurden. Auf diese Weise konnten vier Antikörper gewonnen werden, deren SCLC-Spezifität mittels ELISA und Durchflusszytometrie auf drei SCLC-Zelllinien (NCI-H69, NCI-H82 und DMS273) bestätigt werden konnte. Die Selektion auf den Gewebeschnitten ermöglicht also die effektive Gewinnung von Antikörpern, die spezifisch auf den Patienten zugeschnitten ist. Ein mögliches diagnostisches oder therapeutisches Potential gilt es in weiteren Versuchen zu analysieren.

Summary

Small cell lung cancer (SCLC) metastasizes early and is characterized by its aggressive progression that goes along with a two-year-survival rate of less than five percent. In effective *in vitro* manufacturing process for these antibodies is the Phage-Display-Technology which was used in this study. The method is based on the expression of functional antibody-fragments on the surface of bacteriophages which then could be isolated on the basis of their way of antigen binding. Usually cell lines or purified antigens are used for standard selection procedures, but the antigens are then not given in their natural environment. In this study the selection procedure was carried out on FFPE-slides which contain complex antigen-structures which are in their natural environment. These slides were obtained from standard diagnosis-material. So there was no additional stress for the patients. At first different epitope retrieval procedures were applied to enhance antigen accessibility and immunogenicity. After that the scFv antibody libraries Tomlinson I and J were depleted on healthy lung tissue, to minimize tumor-irrelevant antibodies. Then the selection procedure was performed on SCLC tissue-slides. Hereby we could isolate four antibodies, whose SCLC-specificity was confirmed by ELISA and flow cytometry using SCLC-cell lines (NCI-H69, NCI-H82 and DMS273). According to that the selection on tissue slides enables an effective production of antibodies which are specifically designed for the individual patient. A possible diagnostic or therapeutic potential should be investigated in follow-up studies.

8 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
Ab	<i>antibody</i>
ADEPT	<i>antibody-directed enzyme prodrug therapy</i>
ADCC	<i>antibody dependent cellular cytotoxicity</i> (antikörperabhängige zellvermittelte Toxizität)
ALL	Akute lymphatische Leukämie
Amp	Ampicillin
aqua dest.	Destilliertes Wasser
Bcl-2	B-cell lymphoma 2-Protein (Protoonkogen)
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
C	Celsius
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDC	<i>complement dependent cytotoxicity</i> (komplementabhängige Zytolyse)
CDR	<i>complementarity determining region</i>
CEA	Carcinoembryonales Antigen
cfu	<i>colony forming unit</i>
Da	Dalton (atomare Masseneinheit)
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
DMS 273	SCLC-Zelllinie
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E.coli	Escherichia coli
ED	<i>Extensive Disease</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i> (epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor)
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Fab	<i>fragment antigen binding</i>
FAB	<i>French-American-British</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
Fc	<i>fragment crystallizable</i>
FCS	Fötale Kälberserum
fd	Typ eines filamentösen Bakteriophagen
FDA	<i>U. S. Food and Drug Administration</i>
FFPE	Formalin-fixiert und Paraffin-eingebettet
FuGene	Nicht-liposomales Transfektionsreagenz
Fv	<i>variable fragment</i>
G	Gramm
g	Erdbeschleunigung (Zentrifuge)
gamFITC	<i>Goat anti-mouse fluorescein-labeled antibody</i> (Ziege Anti-maus Fluoreszin-markierter Antikörper)
GFP	<i>green fluorescent protein</i> (grün fluoreszierendes Protein)

Abkürzungsverzeichnis

Gluc	Glucose
Gly	Glycin
h	Stunden
HAMA	<i>Human anti-mouse antibodies</i> (humane anti-Maus Antikörper)
HCl	Salzsäure
HEK	<i>Human Embryonic Kidney-Zellen</i>
HER2/neu	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i> (humaner epidermaler Wachstumsfaktor 2)
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
HIER	<i>heat induced epitope retrieval</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IgG	Immunglobulin G
IGFR	<i>insulin-like growth factor receptor</i> (Insulinartiger Wachstumsfaktor-Rezeptor)
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
L	Liter
LD	<i>Limited Disease</i>
LunX	Lungen-spezifisches X Protein
m	Meter
M	Molarität (mol/L)
M13	Typ eines filamentösen Bakteriophagen
mAb	<i>monoclonal antibody</i>
MF	Membranfragment
min	Minuten
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MPBS	Milchpulver in PBS („phosphate buffered saline“)
mRNA	<i>messenger Ribonukleinsäure</i>
MRD	<i>minimal residual disease</i> (minimale Resterkrankung)
N.	Nervus
NaCl	Natriumchlorid
NCI-H69	SCLC-Zelllinie des <i>National Cancer Institute</i>
NCI-H82	SCLC-Zelllinie des <i>National Cancer Institute</i>
NEBuffer	<i>New England Biolabs</i> Puffer
NotI	Restriktionsenzym
NSCLC	<i>non-small cell lung cancer</i> (nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom)
OD	optische Dichte
OT	Objektträger
P16	<i>cyclin dependent kinase inhibitor 2A</i>
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBST	<i>phosphate buffered saline</i> mit 0,05 % (v/v) Tween 20
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PEG	Polyethylenglycol
Pen	Penicillin

Pfu Pol.	Pfu-Polymerase (thermostabile DNA-Polymerase)
PIER	<i>proteolytic induced epitope retrieval</i>
pIII	Nebenhüllprotein des Phagen
pIT2	Vektor der Tomlinson-Bibliothek
pMS2	Expressionsvektor
pVIII	Haupthüllprotein des Phagen
Ras	Protoonkogen
RB	Retinoblastom-Protein (Tumorsuppressorprotein)
RBS	Ribosomenbindungsstelle
RKI	Robert-Koch-Institut
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute Medium
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
s	Sekunden
scFv	<i>single chain fragment variable</i>
SCLC	<i>small cell lung cancer</i> (kleinzelliges Bronchialkarzinom)
Ser	Serin
SfiI	Restriktionsenzym
SIADH	Syndrom der inadäquaten ADH-Sekretion (Antidiuretisches Hormon)
SOC	<i>Super Optimal broth with Catabolite repression</i> (Nährmedium für Bakterien)
Strep	Streptomycin
SV40TAg	<i>simian virus 40 large T Antigen</i>
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBST	Tris-Buffered Saline mit Tween 20
TEA	Triethylamin
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TG1s	<i>E.coli</i> -Genotyp (speziell für Phage-Display)
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
TNM	<i>Tumor-Node-Metastasis</i> - Klassifikation zur Stadieneinteilung maligner Tumore
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TSA	Tumor-spezifisches Antigen
TTF-1	Thyroidaler Transkriptionsfaktor 1
UICC	<i>Union internationale contre le cancer</i> (Internationale Vereinigung gegen Krebs)
V	Volt
V _H	<i>heavy-chain variable domain</i>
V _L	<i>light-chain variable domain</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)
VLD	<i>Very Limited Disease</i>
W	Watt

Vorsätze

k	Kilo
m	Milli
M	Mega
μ	Mikro
n	Nano

Nukleotide

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

9 Abbildungs- und Tabellennachweis

Abbildung 1: Schematische Darstellung einer Phage-Display Selektionsrunde:	22
Abbildung 2: SCLC-spezifische Phagen-Antikörper aus der Antikörper-Bibliothek I, getestet auf der Zelllinie NCI-H82 in der polyklonalen Durchflusszytometrie.	62
Abbildung 3: SCLC-spezifische Phagen-Antikörper aus der Antikörper-Bibliothek J, getestet auf der Zelllinie NCI-H82 in der polyklonalen Durchflusszytometrie.	63
Abbildung 4: monoklonaler ELISA von der Kompressionsplatte.	69
Abbildung 5: Durchflusszytometrische Analyse der Transfektionseffizienz der HEK-Zellen.	72
Abbildung 6: Western Blot der scFv-Fusionsproteine.	73
Abbildung 7: Coomassie-Färbung der HEK-Zellüberstände.....	74
Abbildung 8: Analyse der Bindeaktivität der SCLC-spezifischen scFv-Fusionsproteine im ELISA.	75
Abbildung 9: Histogramme der Bindeaktivität der SCLC-spezifischen scFv-Fusionsproteine in der Durchflusszytometrie.....	77
Abbildung 10: Analyse der Bindeaktivität der SCLC-spezifischen scFv-Fusionsproteine in der Durchflusszytometrie.	77
Tabelle 1: Klassifikation des SCLC nach der Veterans Administration Lung Study.....	7
Tabelle 2: TNM-Klassifikation der Bronchialkarzinome.	7
Tabelle 3: Klinische Stadiengruppierung des NSCLC.	9
Tabelle 4: Antikörper-Titer für Tomlinson-Antikörper-Bibliothek I.....	61
Tabelle 5: Antikörper-Titer für Tomlinson-Antikörper-Bibliothek J.	61
Tabelle 6: NCI-H82 mit Phagen aus den Bibliotheken I und J in der polyklonalen Durchflusszytometrie.....	66
Tabelle 7: NCI-H69 mit Phagen aus den Bibliotheken I und J in der polyklonalen Durchflusszytometrie.....	66
Tabelle 8: DMS 273 mit Phagen aus den Bibliotheken I und J in der polyklonalen Durchflusszytometrie.....	66
Tabelle 9: PBMC-Zellen mit Phagen aus den Bibliotheken I und J in der polyklonalen Durchflusszytometrie.....	67
Tabelle 10: Auswertung der monoklonalen ELISA-Untersuchungen der J-Masterplatten.	68
Tabelle 11: Transfektionseffizienz der HEK-Zellen.	71

10 Literaturverzeichnis

- [1] J. Ferlay, E. Steliarova-Foucher, J. Lortet-Tieulent, S. Rosso, J. W. W. Coebergh, H. Comber, D. Forman und F. Bray, „Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012“, *European Journal of Cancer*, Bd. 49, S. 1374-1403, 2013.
- [2] J. Ferlay, H.-R. Shin, F. Bray, D. Forman, C. Mathers und D. Parkin, „Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008“, *International Journal of Cancer*, Bd. 127, Nr. 12, S. 2893-2917, 2010.
- [3] RKI (Robert-Koch-Institut), „Krebs in Deutschland 2005-2006, Häufigkeiten und Trends (2010): Eine gemeinsame Veröffentlichung des Robert-Koch-Instituts und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister Deutschland e.V.“, Nr. 7, S. 48-52, 2010.
- [4] R. Govindan, N. Page, D. Morgensztern, W. Read, R. A. Tierney und J. Piccirillo, „Changing Epidemiology of Small-Cell Lung Cancer in the United States Over the Last 30 Years: Analysis of the Surveillance, Epidemiologic, and End Results Database“, *Journal of Clinical Oncology*, Bd. 24, Nr. 28, S. 4539-4544, 2006.
- [5] GEKID – Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland / Robert-Koch-Institut, „Krebs in Deutschland 2005-2006, Häufigkeiten und Trends: Niere“, Bd. 6. Auflage, S. 80-83, 2010.
- [6] Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V., „Onkopedia-Leitlinien - Lungenkarzinom, kleinzellig (SCLC)“, November 2012. www.dgho-onkopedia.de/de/onkopedia/leitlinien/lungenkarzinom-kleinzellig-sclc/index_html.. [Zugriff: Jan. 2013].
- [7] A. Elias, „Small cell lung cancer: state-of-the-art therapy in 1996“, *Chest*, Bd. 112, Nr. 4, S. 251-258, 1997.
- [8] Y. Sekido, K. M. Fong und J. D. Minna, „Progress in understanding the molecular pathogenesis of human lung cancer“, *Biochimica et Biophysica Acta*, Bd. 1378, Nr. 1, S. F21-F59, 1998.
- [9] M. J. Thun et al., „Cigarette Smoking and Changes in the Histopathology of Lung Cancer“, *JNCI J Natl Cancer Inst*, Bd. 89, Nr. 21, S. 1580-1586, 1997.
- [10] Roche Lexikon Medizin, München: Urban & Fischer, 5. Auflage, 2003.
- [11] E. Grundmann et al., Allgemeine Pathologie und Grundlagen der speziellen Pathologie, München: Urban & Fischer, 11. Auflage, 2008.

- [12] K. Arastéh und H.-W. Baenkler, „Tumoren der Bronchien und der Lunge“, in s *Innere Medizin*, Stuttgart, Thieme, 2013, p. 421ff.
- [13] Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V., „Onkopedia-Leitlinien - Lungenkarzinom, nicht-kleinzellig (NSCLC)“, Oktober 2012. <http://www.dgho-onkopedia.de/de/onkopedia/leitlinien/lungenkarzinom-nicht-kleinzellig-nsclc/lungenkarzinom-nicht-kleinzellig-nsclc.pdf>. [Zugriff: Jan.2013].
- [14] K. Pantel, R. J. Cote und O. Fodstad, „Detection and Clinical Importance of Micrometastatic Disease“, *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, Bd. 91, Nr. 13, S. 113-1124, 1999.
- [15] M. Alamgeer et al., „Cancer stem cells in lung cancer: Evidence and controversies“, *Respirology*, Bd. 18, S. 757-764, 213.
- [16] D. G. Haller, „An overview of adjuvant therapy for colorectal cancer“, *European Journal of Cancer*, Bd. 31, Nr. 7-8, S. 1255-1263, 1995.
- [17] M. S. Topp et al., „Targeted Therapy With the T-Cell-Engaging Antibody Blinatumomab of Chemotherapy-Refractory Minimal Residual Disease in B-Lineage Acute Lymphoblastic Leukemia Patients Results in High Response Rate and Prolonged Leukemia-Free Survival“, *Journal of Clinical Oncology*, Bd. 29, Nr. 18, S. 2493-2498, 2011.
- [18] D. Hanahan und R. A. Weinberg, „Hallmarks of Cancer: The Next Generation“, *Cell*, Bd. 144, S. 646-674, 2011.
- [19] H. U. Käfferlein und T. Brüning, „„Hanahan und Weinberg“ – Ein Leitfaden auch für toxikologische Forschung?“, *IPA-Journal*, Bd. 02/2012, S. 22-23, 2012.
- [20] R. Pirker und M. Filipits, „Targeted Therapies in Lung Cancer“, *Current Pharmaceutical Design*, Bd. 15, S. 188-206, 2009.
- [21] M. Fukuoka et al., „Multi-Institutional Randomized Phase II Trial of Gefitinib for Previously Treated Patients With Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer“, *Journal of Clinical Oncology*, Bd. 21, Nr. 12, S. 2237-2246, 2003.
- [22] N. Ferrara, H.-P. Gerber und J. LeCouter, „The biology of VEGF and its receptors“, *nature medicine*, Bd. 9, Nr. 6, S. 669-676, 2003.
- [23] G. Mountzios, G. Pentheroudakis und P. Carmeliet, „Bevacizumab and micrometastases: Revisiting the preclinical and clinical rollercoaster“, *Pharmacology & Therapeutics*, Bd. 141, S. 117-124, 2014.
- [24] J. M. L. Ebos, C. R. Lee, W. Cruz-Munoz, G. A. Bjarnason, J. G. Christensen und R. S. Kerbel, „Accelerated Metastasis after Short-Term Treatment with a Potent Inhibitor of Tumor

- Angiogenesis“, *Cancer Cell*, Bd. 15, S. 232-239, 2009.
- [25] M. Pàez-Ribes et al., „Antiangiogenic Therapy Elicits Malignant Progression of Tumors to Increased Local Invasion and Distant Metastasis“, *Cancer Cell*, Bd. 15, S. 220-231, 2009.
- [26] V. L. Capelozzi, „Role of immunohistochemistry in the diagnosis of lung cancer“, *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, Bd. 35, Nr. 4, S. 375-382, 2009.
- [27] G. Goeckenjan et al., „Interdisziplinäre S3-Leitlinie: Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms“, pp 18ff., 2010. http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/020-007_S3_Praevention__Diagnostik__Therapie_und_Nachsorge_des_Lungenkarzinoms_lang_02-2010_02-2015.pdf [Zugriff: Jan. 2016]
- [28] World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, International Association for the Study of Lung Cancer, & International Academy of Pathology, „Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus and heart.“, *Lyon : Oxford: IARC Press, Oxford University Press.*, 2004.
- [29] C. Aggarwal, N. Somaiah und G. Simon, „Antiangiogenic agents in the management of non-small cell lung cancer: Where do we stand now and where are we headed?“, *Cancer Biology & Therapy*, Bd. 13, Nr. 5, S. 247-263, 2012.
- [30] A. Sandler, R. Gray, M. C. Perry, J. Brahmer, J. H. Schiller, A. Dowlati, R. Lilenbaum und D. H. Johnson, „Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer“, *New England Journal of Medicine*, Bd. 355, Nr. 24, S. 2542-2550, 2006.
- [31] European Medicines Agency, „Avastin“, 15.08.2014.
http://www.ema.europa.eu/docs/de_DE/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/000582/WC500029260.pdf. [Zugriff: Sept. 2014].
- [32] J. Baselga und C. L. Arteaga, „Critical Update and Emerging Trends in Epidermal Growth Factor Receptor Targeting in Cancer“, *Journal of Clinical Oncology*, Bd. 23, Nr. 11, S. 2445-2459, 2005.
- [33] R. Pirker et al., „EGFR expression as a predictor of survival for first-line chemotherapy plus cetuximab in patients with advanced non-small-cell lung cancer: analysis of data from the phase 3 FLEX study“, *The Lancet Oncology*, Bd. 13, Nr. 1, S. 33-42, 2012.
- [34] Costanzo R. et. al., „Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer With Epidermal Growth Factor Receptor Mutations - Current Evidence and Future Perspectives“, *Expert Review of Anticancer Therapy*, Bd. 13, Nr. 10, S. 1207-1218, 2013.
- [35] V. Nelson et al., „Afatinib: emerging next-generation tyrosine kinase inhibitor for NSCLC“,

OncoTargets and Therapy, Nr. 6, S. 135-143, 2013.

- [36] N. Thatcher et al., „Gefitinib plus best supportive care in previously treated patients with refractory advanced non-small-cell lung cancer: results from a randomised, placebo-controlled, multicentre study (Iressa Survival Evaluation in Lung Cancer)“, *Lancet*, Bd. 366, S. 1527-1537, 2005.
- [37] G. Giaccone et al., „Gefitinib in Combination With Gemcitabine and Cisplatin in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: A Phase III Trial—INTACT 1“, *Journal of Clinical Oncology*, Bd. 22, Nr. 5, S. 777-784, 2004.
- [38] G. Giaccone et al., „Gefitinib in Combination With Paclitaxel and Carboplatin in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: A Phase III Trial—INTACT 2“, *Journal of Clinical Oncology*, Bd. 22, Nr. 5, S. 785-794, 2004.
- [39] Y. Zhang und J. He, „The development of targeted therapy in small cell lung cancer“, *Journal of Thoracic Disease*, Bd. 5, Nr. 4, S. 538-548, 2013.
- [40] B. J. Schneider, G. P. Kalemkerian, N. Ramnath, M. J. Kraut, A. J. Wozniak, F. P. Worden, J. C. Ruckdeschel, X. Zhang, W. Chen und S. M. Gadgeel, „Phase II Trial of Imatinib Maintenance Therapy After Irinotecan and Cisplatin in Patients With c-Kit-Positive, Extensive-Stage Small-Cell Lung Cancer“, *Clinical Lung Cancer*, Bd. 11, Nr. 4, S. 223-227, 2010.
- [41] S. S. Ramalingam, C. F. Belani, P. C. Mack, E. E. Vokes, J. Longmate, R. Govindan, M. Koczywas, S. F. Ivy und D. R. Gandara, „Phase II study of Cediranib (AZD 2171), an inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor, for second-line therapy of small cell lung cancer (National Cancer Institute #7097)“, *Journal of Thoracic Oncology*, Bd. 5, Nr. 8, S. 1279-1284, 2010.
- [42] A. M. Arnold, L. Seymour, M. Smylie, K. Ding, Y. Ung, B. Findlay, C. W. Lee, M. Djurfeldt, M. Whitehead, P. Ellis, G. Goss, A. Chan, J. Meharchand, Y. Alam, R. Gregg, C. Butts, P. Langmuir und F. Shepherd, „Phase II study of vandetanib or placebo in small-cell lung cancer patients after complete or partial response to induction chemotherapy with or without radiation therapy: National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study BR.20.“, *Journal of Clinical Oncology*, Bd. 25, Nr. 27, S. 4278-4284, 2007.
- [43] A. Moore, L. H. Einhorn, D. Estes, R. Govindan, J. Axelson, J. Vinson, T. E. Breen, M. Yu und N. H. Hanna, „Gefitinib in patients with chemo-sensitive and chemo-refractory relapsed small cell cancers: a Hoosier Oncology Group phase II trial“, *Lung Cancer*, Bd. 52, Nr. 1, S. 93-97, 2006.

- [44] L. Gandhi, H. M. W. M. Neubauer, C. J. Langer, M. Moore, H. J. Ross, B. E. Johnson und T. J. Lynch, „A phase II study of the safety and efficacy of the multidrug resistance inhibitor VX-710 combined with doxorubicin and vincristine in patients with recurrent small cell lung cancer.“, *Cancer*, Bd. 109, Nr. 5, S. 924-932, 2007.
- [45] M. Lucchi, A. Mussi, G. Fontanini, P. Faviana, A. Ribechini und C. A. Angeletti, „Small cell lung carcinoma (SCLC): the angiogenic phenomenon.“, *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, Bd. 21, Nr. 6, S. 1105-1110, 2002.
- [46] S. Tanno, Y. Ohsaki, K. Nakanishi, E. Toyoshima und K. Kikuchi, „Human small cell lung cancer cells express functional VEGF receptors, VEGFR-2 and VEGFR-3.“, *Lung Cancer*, Bd. 46, Nr. 1, S. 11-19, 2004.
- [47] D. R. Spigel, F. A. Greco, J. D. Zubkus, P. B. Murphy, R. A. Saez, C. Farley, D. A. Yardley, H. A. Burris und J. D. Hainsworth, „Phase II trial of irinotecan, carboplatin, and bevacizumab in the treatment of patients with extensive-stage small-cell lung cancer.“, *Journal of Thoracic Oncology*, Bd. 4, Nr. 12, S. 1555-1560, 2009.
- [48] D. R. Spigel, P. M. Townley, D. M. Waterhouse, L. Fang, I. Adiguzel, J. E. Huang, D. A. Karlin, L. Faoro, F. A. Scappaticci und S. M. A., „Randomized phase II study of bevacizumab in combination with chemotherapy in previously untreated extensive-stage small-cell lung cancer: results from the SALUTE trial.“, *Journal of Clinical Oncology*, Bd. 29, Nr. 16, S. 2215-2222, 2011.
- [49] Roche Pharma AG, „Fachinformation Avastin“, Juli 2015. <http://www.fachinfo.de/pdf/008726>. [Zugriff: Nov.2015].
- [50] B. E. Lally, J. J. Urbanic, A. W. Blackstock, A. A. Miller und M. C. Perry, „Small Cell Lung Cancer: Have We Made Any Progress Over the Last 25 Years?“, *The Oncologist*, Bd. 12, Nr. 9, S. 1096-1104, 2007.
- [51] T. Seute, P. Leffers, G. P. ten Velde und A. Twijnstra, „Neurologic disorders in 432 consecutive patients with small cell lung carcinoma“, *Cancer*, Bd. 100, Nr. 4, S. 801-806, 2004.
- [52] G. Köhler und C. Milstein, „Continuous Cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity“, *Nature*, Bd. 256, Nr. 5517, S. 495-497, 1975.
- [53] G. Haaf und P. Jennrich, „Köhlers Spürhunde“, *DIE ZEIT*, <http://www.zeit.de/1984/44/koehlers-spuerhunde>, 1984. [Zugriff: März 2014]
- [54] N. K. Jerne, „The Natural-Selection Theory of Antibody Formation“, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, Bd. 41, Nr. 11, S. 849-857, 1955.

- [55] U. Sack und F. Emmrich, „Monoklonale Antikörper“, *Internist*, Bd. 49, S. 919-928, 2008.
- [56] M. Spence (Hrsg.), „Recombinant Antibodies: A new gold standard“, *BioProbes*, Bd. 67, S. 18-19, 2012.
- [57] A. Jakobovits, R. G. Amado, X. Yang, L. Roskos und G. Schwab, „From XenoMouse technology to panitumumab, the first fully human antibody product from transgenic mice“, *nature biotechnology*, Bd. 25, Nr. 10, S. 1334-1343, 5 Oktober 2007.
- [58] European Medicines Agency, „EPAR summary for the public - Humira adalimumab“, Juli 2015. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/000481/WC500050865.pdf. [Zugriff: Nov. 2015].
- [59] L. G. Presta, „Engineering of therapeutic antibodies to minimize immunogenicity and optimize function“, *Engineered Antibody Therapeutics*, Bd. 58, Nr. 5-6, S. 640-656, 2006.
- [60] Rote Liste - PatientenInfoService, „Herceptin® 600 mg/5 ml Injektionslösung zur subkutanen Anwendung“, Juli 2015. <http://www.patienteninfo-service.de/a-z-liste/h/herceptinR-600-mg5-ml-injektionsloesung-zur-subkutanen-anwendung/>. [Zugriff: Dez. 2015].
- [61] P. Carter, L. Smith und M. Ryan, „Identification and validation of cell surface antigens for antibody targeting in oncology“, *Endocrine-Related Cancer*, Bd. 11, S. 659-687, 2004.
- [62] B. A. Teicher und R. V. J. Chari, „Antibody Conjugate Therapeutics: Challenges and Potential“, *Clinical Cancer Research*, Bd. 17, S. 6389-6397, 2011.
- [63] D. L. Ludwig, D. S. Pereira, Z. Zhu, D. J. Hicklin und P. Bohlen, „Monoclonal antibody therapeutics and apoptosis“, *Oncogene*, Bd. 22, S. 9097-9106, 2003.
- [64] R. J. Kreitman und I. Pastan, „Antibody-fusion proteins: anti-CD22 recombinant immunotoxin: moxetumomab pasudotox“, *Clinical Cancer Research*, Bd. 17, S. 6398-6405, 2011.
- [65] S. Barth, N. Berges, G. Hehmann-Titt, D. Hristodorov, G. Melmer und T. Thepen, „Human Cytolytic Fusion Proteins: Modified Versions of Human Granzyme B and Angiogenin Have the Potential to Replace Bacterial Toxins in Targeted Therapies against CD64+ Diseases“, *Antibodies*, Bd. 3, S. 92-115, 2014.
- [66] Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO) e.V., „Leitlinienprogramm Onkologie - Hodgkin Lymphom“, AWMF, Februar 2013. http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/018-029l_S3_Hodgkin_Lymphom_Diagnostik_Therapie_Nachsorge_bei_Erwachsenen_2015-01.pdf. [Zugriff: Okt. 2015].
- [67] Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft, „Kadcyla (Trastuzumab Emtansin)“, 2014, <http://www.akdae.de/Arzneimitteltherapie/NA/Archiv/201404-Kadcyla.pdf>. [Zugriff: Nov.

- 2015].
- [68] U. H. Weidle, G. Georges und U. Brinkmann, „Fully Human Targeted Cytotoxic Fusion Proteins: New Anticancer Agents on the Horizon“, *Cancer Genomics & Proteomics*, Bd. 9, S. 199-134, 2012.
- [69] H. R. Hoogenboom, „Selecting and screening recombinant antibody libraries“, *nature biotechnology*, Bd. 23, Nr. 9, S. 1105-1114, 2005.
- [70] G. P. Smith, „Filamentous Fusion Phage: Novel Expression Vectors That Display Cloned Antigens on the Virion Surface“, *Science*, Bd. 228, S. 1315-1316, 1985.
- [71] J. Bazan, I. Calkosinski und A. Gamian, „Phage Display-A powerful technique for immunotherapy: 1. Introduction and potential of therapeutic applications“, *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, Bd. 8, Nr. 12, S. 1817-1828, 2012.
- [72] J. Bazan, I. Calkosinski und A. Gamian, „Phage Display-A powerful technique for immunotherapy“, *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, Bd. 8, Nr. 12, S. 1817-1828, 2012.
- [73] C. F. Barbas III, D. R. Burton und S. J. K., *Phage Display: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor (USA): Cold Spring Harbor Laboratory, 2011.
- [74] A. D. Griffiths und A. R. Duncan, „Strategies for selection of antibodies by phage display“, *Current Opinion in Biotechnology*, Bd. 9, S. 102-108, 1998.
- [75] B. Lipes, Y. Chen, H. Ma, H. Staats, D. Kenan und M. D. Gunn, „An entirely cell-based system to generate single-chain antibodies against cell surface receptors.“, *Journal of Molecular Biology*, Bd. 379, Nr. 2, S. 261-272, 2008.
- [76] H. Lu, D. Jin und Y. L. Kapilla, „Application of laser capture microdissection to phage display peptide library screening“, *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, Bd. 98, Nr. 6, S. 692-697, 2004.
- [77] W. Ruan, A. Sassoon, F. An, J. P. Simko und B. Liu, „Identification of Clinical Significant Tumor Antigens by Selecting Phage Antibody Library on Tumor Cells in Situ Using Laser Capture Microdissection“, *Molecular & Cellular Proteomics*, Bd. 5, Nr. 12, S. 2364-2373, 2006.
- [78] N. Kubo, N. Akita, A. Shimizu, H. Kitahara, A. L. Parker und S. Miyagawa, „Identification of oligopeptide binding to colon cancer cells separated from patients using laser capture microdissection“, *Journal of Drug Targeting*, Bd. 16, Nr. 5, S. 396-404, 2008.
- [79] T. Tanaka, T. Ito, M. Furuta, C. Eguchi, H. Toda, E. Wakabayashi-Takai und K. Kaneko, „In Situ Phage Screening“, *The Journal of Biological Chemistry*, Bd. 277, Nr. 33, S. 30382-30387,

2002.

- [80] Y. Sun, G. S. Shukla, G. G. Kennedy, D. M. Warshaw, D. L. Weaver, S. C. Pero, L. Floyd und D. N. Krag, „Biopanning Phage-Display Libraries on Small Tissue Sections Captured by Laser Capture Microdissection“, *Journal of Biotech Research*, Bd. 1, Nr. 1, S. 55-63, 2009.
- [81] M. D. Sørensen, I. E. Agerholm, B. Christensen, S. Kølvråa und P. Kristensen, „Microselection - affinity selecting antibodies against a single rare cell in a heterogeneous population“, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, Bd. 14, Nr. 7, S. 1953-1961, 2010.
- [82] T. Jarutat, C. Nickels, C. Frisch, F. Stellmacher, K. P. Hofig, A. Knappik und H. Merz, „Selection of vimentin-specific antibodies from the HuCAL® phage display library by subtractive panning on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue“, *Journal of Biological Chemistry*, Bd. 388, S. 651-658, 2007.
- [83] G. Soltes, M. Hust, K. K. Y. Ng, A. Bansal, J. Field, D. I. H. Stewart, S. Dübel, S. Cha und E. J. Wiersma, „On The Influence Of Vector Design On Antibody Phage Display“, *Journal of Biotechnology*, Bd. 127, Nr. 4, S. 626-637, 2007.
- [84] A. R. M. Bradbury und J. D. Marks, „Antibodies from phage antibody libraries“, *Journal of Immunological Methods*, Bd. 290, S. 29-49, 2004.
- [85] S. Rondot, J. Koch, F. Breitling und S. Dübel, „A helper phage to improve single-chain antibody presentation in phage display“, *Nature Biotechnology*, Bd. 19, S. 75-78, 2001.
- [86] C. F. Barbas III, D. R. Burton, J. K. Scott und G. J. Silverman, „Chapter 2: Phage-display Vectors“, in s *Phage Display: A Laboratory Manual*, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, S. 2.1-2.19.
- [87] G. Winter, A. D. Griffiths, R. E. Hawkins und H. R. Hoogenboom, „Making antibodies by phage display technology“, *Annual Review of Immunology*, Bd. 12, S. 433-455, 1994.
- [88] L. Chasteen, J. Ayriss, P. Pavlik und A. R. M. Bradbury, „Eliminating helper phage from phage display“, *Nucleic Acids Research*, Bd. 34, Nr. 21, 2006.
- [89] H. Thie, „Affinity Maturation by Random Mutagenesis and Phage Display“, in s *Springer Protocols - Antibody Engineering*, Berlin/Heidelberg, Springer-Verlag, 2010, S. 397-409.
- [90] „Human Single Fold scFv Libraries I + J (Tomlinson I + J) Protocol.“,
<http://lifesciences.sourcebioscience.com/media/143421/tomlinsonij.pdf>. [Zugriff am Oktober 2014].
- [91] L. J. e. a. Schwimmer, „Discovery of diverse and functional antibodies from large human repertoire antibody libraries“, *Journal of Immunological Methods*, Bd. 391, Nr. 1-2, S. 60-

- 71, 2013.
- [92] P. Chames und K. Even-Desrumeaux, „Phage Display and Selections on Cells“, *Methods in Molecular Biology*, Bd. 907, S. 225-235, 2012.
- [93] P. Chames und J. Matz, „Phage Display and Selections on Purified Antigens“, in *Springer Protocols - Antibody Engineering*, Bd. 907, Heidelberg/Berlin, Springer-Verlag, 2012, S. 213-224.
- [94] S. H. Ali und J. A. DeCaprio, „Cellular transformation by SV40 large T antigen: interaction with host proteins“, *Cancer Biology*, Bd. 11, S. 15-22, 2001.
- [95] Z. Huang, G. Li, W. Pei, L. A. Sosa und L. Niu, „Enhancing protein expression in single HEK 293 cells“, *Journal of Neuroscience Methods*, Bd. 142, S. 159-166, 2005.
- [96] S. Barth, M. Huhn, B. Matthey, S. Tawadros, R. Schnell, T. Schinköthe, V. Diehl und A. Engert, „Ki-4(scFv)-ETA', a new recombinant anti-CD30 immunotoxin with highly specific cytotoxic activity against disseminated Hodgkin tumors in SCID mice.“, *Blood*, Bd. 95, Nr. 12, S. 3909-3914, 95 2000.
- [97] V. Lorbach, „Von Chorismat abgeleitete funktionalisierte Cyclohexadiene: Verwendung als chirale Synthesebausteine und Erweiterung der mikrobiell zugänglichen Produktpalette um einen Aminoalkohol“, *Schriften des Forschungszentrums Jülich. Reihe Lebenswissenschaften/Life Sciences*, Bd. 39, S. 44, 2007.
- [98] Invitrogen by Life Technologies, „User Guide pSecTag2/Hygro A, B, and C“, Bd. Catalog number, S. 1-24, 2012.
- [99] J. Fitting, „Generierung, Charakterisierung und Funktionalisierung rekombinanter Antikörperfragmente gegen leukämische und dendritische Zellen“, in *s Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der RWTH Aachen University zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation*, 2012, S. 48.
- [100] L. L. Green et al., „Antigen-specific human monoclonal antibodies from mice engineered with human Ig heavy and light chain YACs“, *Nature Genetics*, Bd. 7, S. 13-21, 1994.
- [101] J. Ni, „New Technologies for the Generation of Human Monoclonal Antibody“, *Trends in Bio/Pharmaceutical Industry*, Bd. 5, Nr. 3, S. 1-12, 2009.
- [102] M. Werner, A. Chott, A. Fabiano und H. Battifora, „Effect of Formalin Tissue Fixation and Processing on Immunohistochemistry“, *The American Journal of Surgical Pathology*, Bd. 24, Nr. 7, S. 1016-1019, 2000.

- [103] M. A. Rubin, „Use of laser capture microdissection, cDNA microarrays, and tissue microarrays in advancing our understanding of prostate cancer“, *Journal of Pathology*, Bd. 195, S. 80-86, 2001.
- [104] P. P. Sche, K. M. McKenzie, J. D. White und D. J. Austin, „Display cloning: functional identification of natural product receptors using cDNA-phage display“, *Chemistry & Biology*, Bd. 6, S. 707-716, 1999.
- [105] J. Carcamo, M. W. Ravera, R. Brissette, O. Dedova, J. R. Beasley, A. Alam-Moghe, C. Wan, A. Blume und W. Mandecki, „Unexpected frameshifts from gene to expressed protein in a phage-displayed peptide library“, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Bd. 95, S. 11146-11151, 1998.
- [106] P. N. Black, B. Said, C. R. Ghosn, J. V. Beach und W. D. Nunn, „Purification and Characterization of Outer Membrane-bound Protein Involved in Long-chain Fatty Acid Transport“, *Journal of Biological Chemistry*, Bd. 262, Nr. 3, S. 1412-1419, 1986.
- [107] C. M. Lee, N. Iorno, F. Sierro und D. Christ, „Selection of human antibody fragments by phage display“, *Nature Protocols*, Bd. 2, Nr. 11, S. 3001-3008, 2007.
- [108] S. P. U. Pathak, „Factors Influencing Immunogenicity“, in *Immunology: Essential and Fundamental*, Science Publishers, 2005, S. 79-86.
- [109] A. Nissim, H. R. Hoogenboom, I. M. Tomlinson, G. Flynn, G. Lane und G. Winter, „Antibody fragments from a 'single pot' phage display library as immunochemical reagents“, *The EMBO Journal*, Bd. 13, Nr. 3, S. 692-698, 1994.
- [110] G. Å. Løset, B. Bogen und I. Sandlie, „Expanding the Versatility of Phage Display I: Efficient Display of Peptide-Tags on Protein VII of the Filamentous Phage“, *Public Library of Science online*, Bd. 6, Nr. 2, 2011.
- [111] P. Hollinger und P. J. Hudson, „Engineered antibody fragments and the rise of single domains“, *nature biotechnology*, Bd. 23, Nr. 9, S. 1126-1136, 2005.
- [112] Z. A. Ahmad, S. K. Yeap, A. M. Ali, W. Y. Ho, N. B. M. Alitheen und M. Hamid, „scFv Antibody: Principles and Clinical Application“, *Clinical and Developmental Immunology* online, 2012.
- [113] H. Sanmark, T. Huovinen, T. Pettersson, M. Lahti und U. Lamminmäki, „Fast conversion of scFv to Fab antibodies using type IIs restriction enzymes“, *Journal of Immunological Methods*, 2015.
- [114] A. Younes, N. L. Bartlett, J. P. Leonard, D. A. Kennedy, C. M. Lynch, E. L. Sievers und A. Forero-Torres, „Brentuximab Vedotin (SGN-35) for Relapsed CD30-Positive Lymphomas“, *The New*

- England Journal of Medicine*, Bd. 363, S. 1812-1821, 2010.
- [115] D. Hristodorov, R. Mladenov, A. Pardo, A.-T. Pham, M. Huhn, R. Fischer, T. Thepen und S. Barth, „Microtubule-associated protein tau facilitates the targeted killing of proliferating cancer cells in vitro and in a xenograft mouse model in vivo“, *British Journal of Cancer*, Bd. 109, Nr. 6, S. 1570-1578, 2013.
- [116] M. Mathew und R. S. Verma, „Humanized immunotoxins: a new generation of immunotoxins for targeted cancer therapy“, *Cancer science*, Bd. 100, Nr. 8, S. 1359-1365, 2009.
- [117] Z. Li, T. Yu, P. Zhao und J. Ma, „Immunotoxins and cancer therapy“, *Cellular & Molecular Immunology*, Bd. 2, Nr. 2, S. 106-112, 2005.
- [118] R. J. Kreitman, „Immunotoxins for targeted cancer therapy“, *AAPS Journal*, Bd. 8, Nr. 3, S. E532-E551, 2006.
- [119] A. Hauk, „Preteinen durch Immunpräzipitation auf der Spur“, *Biologie unserer Zeit*, Bd. 44, Nr. 1, S. 18, 2014.
- [120] D. K. Hossfeld, K. Pantel, S. B. Hosch und J. R. Izbicki, „ Minimale residuale Tumorerkrankung bei soliden epithelialen Tumoren: Stand der Forschung und Implikationen für die Therapie“, *Dtsch Arztebl*, Bd. 97, Nr. 22, S. A-1526 - A-1532, 2000.
- [121] J. Chudacek et al., „Detection of minimal residual disease in lung cancer“, *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.*, Bd. 157, S. 1-5, 2013.
- [122] F. Buccisano et al., „Prognostic and therapeutic implications of minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia“, *Blood*, Bd. 119, Nr. 2, S. 332-341, 2012.
- [123] L. Ducry und B. Stump, „Antibody-Drug Conjugates: Linking Cytotoxic Payloads to Monoclonal Antibodies“, *Bioconjugate Chemistry*, Bd. 21, Nr. 1, S. 5-13, 2010.
- [124] R. J. Kreitman, W. H. Wilson, K. Bergeron, M. Raggio, M. Stetler-Stevenson, D. J. FitzGerald und I. Pastan, „Efficacy of the Anti-CD22 Recombinant Immunotoxin BL22 in Chemotherapy-Resistant Hairy-Cell Leukemia“, *New England Journal of Medicine*, Bd. 345, Nr. 4, S. 241-247, 2001.

11 Anhang

11.1 Mutagenese-Primer

Die unten aufgelisteten Primer wurden für die ortsgerichtete Mutagenese verwendet (siehe 4.2.7, S. 49). Während dieser Mutagenese wurden die Amber Stopp-Codons (TAG) in den scFv-Genfragmenten durch die Aminosäure Glutamin (CAG) ersetzt.

Bezeichnung	Sequenz 5' - 3'
2C 3'	GAT GTA TGA CCA CCC TGC CTC GTA ATC GAT GAG AC
2C 5'	GTC TCA TCG ATT ACG AGG CAG GGT GGT CAT ACA TC
3B 3'	GTC TTC AGA CCC CAC TGA GAA ATA GTT GAG ACC CAC
3B 5'	GTG GGT CTC AAC TAT TTC TCA GTG GGG TCT GAA GAC
3E 3'	CAC GGA GTC TGC GTA CTG TGT AGA AGC ACC AGT CCG
3E 5'	CGG ACT GGT GCT TCT ACA CAG TAC GCA GAC TCC GTG
3G 3'	GTC AAA CCA CCA GAC TGA GAA ATA GTT GAG ACC CAC
3G 5'	GTG GGT CTC AAC TAT TTC TCA GTC TGG TGG TTT GAC
6E 3'	CTT TGT ATG CTG ACC CTG CCC AGA AAT ACG TGA GAC
6E 5'	GTC TCA CGT ATT TCT GGG CAG GGT CAG CAT ACA AAG
11D 3'	CAC GGA GTC TGC GTA CTG TGT AGT ACT ACC ATT ATG
11D 5'	CAT AAT GGT AGT ACT ACA CAG TAC GCA GAC TCC GTG

12 Publikationsverzeichnis

A. ten Haaf, S. Pscherer, **K. Fries**, S. Barth, S. Gattenlöhner und M. K. Tur: „Phage display-based on-slide-selection of tumor-specific antibodies on formalin-fixed paraffin-embedded human tissue biopsies”, *Immunology Letters*, Bd. 166, S. 65-78, 2015.

13 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.“

Ort, Datum

Unterschrift

14 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Stefan Gattenlöhner, Direktor des Instituts, für die Möglichkeit meine Dissertation am Institut für Pathologie in Gießen durchführen zu können, sowie für das mir entgegengebrachte Vertrauen und die Übernahme des Erstgutachtens.

Vielen Dank an Frau Prof. Dr. Monika Wimmer für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ich danke Herrn Dr. Mehmet Kemal Tur für die Vergabe dieses interessanten Themas und die hervorragende Betreuung, sowie die Korrektur meiner Arbeit.

Ein besonders großer Dank gilt Herrn Dr. Andre ten Haaf und Frau Sibylle Pscherer, die mir während meiner praktischen Arbeit im Labor jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen und mit denen mir die Zusammenarbeit jederzeit viel Freude bereitet hat. Außerdem bedanke ich mich bei Herrn Dr. ten Haaf für die vielen hilfreichen Tipps während meiner schriftlichen Ausarbeitung.

Auch den übrigen Mitarbeitern des Instituts für Pathologie gilt mein Dank für die freundliche Aufnahme und Unterstützung während meiner Tätigkeit.

Des Weiteren danke ich insbesondere meinen Eltern und Großeltern, Renate, Peter, Bärbel, Burkhard und Daniel, sowie Alex, Lisa, Tanja und Tina. Ohne eure bedingungslose Unterstützung und Motivation wäre diese Dissertation nicht möglich gewesen.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6612-3



9 17 8 3 8 3 5 19 6 6 1 2 3