

**Generierung von humanen Antikörperfragmenten
für die
zielgerichtete Immuntherapie
der
Akuten Myeloischen Leukämie**

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

vorgelegt von
Theresa Weber
aus Alsfeld

Gießen, 2020

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen,
Institut für Pathologie

Gutachter:

Prof. Dr. Stefan Gattenlöhner

Gutachter:

Prof. Dr. Mathias Rummel

Tag der Disputation:

13. September 2021

Erklärung zur Dissertation

„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 nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der 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

Genderhinweis zur Dissertation

Zur Verbesserung der Lesbarkeit wird in vorliegender Dissertation i.d.R. das generische Maskulinum verwendet. Derartige Formulierungen schließen Männer und Frauen gleichermaßen mit ein.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1
1.1 Akute Myeloische Leukämie	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Pathogenese	2
1.1.3 Klinik.....	4
1.1.4 Diagnosekriterien	4
1.1.5 WHO-Klassifikation (2016).....	5
1.1.5.1 FAB-Klassifikation (1985).....	5
1.1.6 Risikogruppen gemäß European LeukemiaNet (ELN 2017).....	7
1.1.7 Überblick: Aktueller Stand der Therapie.....	8
1.2 Antikörper	10
1.2.1 Aufbau eines Antikörpers	11
1.2.2 Single-chain fragment variable (scFv).....	13
1.3 Phage Display	15
1.3.1 Biologie der Phagen	16
1.3.2 pIII-Expressionssystem	17
1.3.3 Original-Bibliothek Tomlinson J.....	20
1.3.3.1 Nonsense-Codons und Suppressorstämme	21
1.3.4 Prinzip des Phage Displays.....	22
1.3.5 Prozedere des Phage Displays	23
1.3.5.1 Depletion	25
1.3.5.2 Selektion.....	25
1.3.5.3 Waschung	28
1.4 Ziel der Dissertation	28
Material und Methoden	30
2.1 Literaturrecherche	30
2.2 Materialaufstellung	30
2.3 Primer	30
2.3.1 Sequenzierungsprimer	30
2.3.2 Mutageneseprimer	31

2.4	Vektoren	32
2.4.1	pIT2-Vektor.....	32
2.4.2	pMS2-Vektor	33
2.5	Humane Spenderzellen	34
2.5.1	AML-Patienten.....	34
2.5.2	Gesunde Blutspender.....	34
2.6	Zelluläre und zellbiologische Methoden	34
2.6.1	Dichtegradientenzentrifugation.....	34
2.6.2	Zellzahlermittlung	35
2.6.3	Kryokonservierung	36
2.6.4	Konventionelle Durchflusszytometrie	36
2.6.4.1	Kontrollen	37
2.6.4.2	Histogramme - Gatingstrategie	39
2.6.4.3	Dot Plots - Gatingstrategie	39
2.6.4.4	Hinweis	40
2.6.5	Spektrale Durchflusszytometrie.....	40
2.6.5.1	Kontrollen	40
2.6.6	Bestimmung des prozentualen Anteils an Blasten	41
2.6.6.1	Gatingstrategie	42
2.6.7	Immunmagnetische Separation.....	43
2.6.8	Erythrozytenlyse.....	43
2.6.9	Adhärenzanreicherung von Monozyten.....	44
2.6.10	Herstellung von Cytospins.....	44
2.7	Phage Display	45
2.7.1	Allgemeines Schema.....	45
2.7.1.1	Tag 1, Bakterienanzucht	45
2.7.1.2	Tag 2, Phagenproduktion	45
2.7.1.3	Tag 3, Phagenfällung	46
2.7.1.4	Tag 4, Panning	48
2.7.1.5	Tag 5, Kryokonservierung	51
2.7.2	Polyklonale Phagenanalyse – Testung des Phagenpools	52
2.7.2.1	Kontrollen	53
2.7.2.2	Auswertungskriterien.....	53
2.7.3	Monoklonale Phagenanalyse – Massentestung individueller Phagen ..	53
2.7.3.1	Kontrollen	55
2.7.3.2	Auswertungskriterien.....	55

2.7.4	Einzelphagenanalyse – Testung titrierter individueller Phagen.....	56
2.7.4.1	Auswertungskriterien	57
2.8	Molekularbiologische Methoden	57
2.8.1	Plasmidpräparation	57
2.8.2	Photometrische Messung von Nukleinsäure	57
2.8.3	Polymerase-Kettenreaktion	58
2.8.4	Sanger-Sequenzierung	58
2.8.4.1	Externe Sequenzierung.....	59
2.8.5	Ortsspezifische Mutagenese	59
2.8.6	Hitzeschocktransformation in XL1-Blue	61
2.8.7	Kolonie-Polymerase-Kettenreaktion.....	61
2.8.8	Agarosegelelektrophorese	62
2.8.9	Klonierung in den pMS2-Vektor	63
2.8.10	Transfektion von HEK293T-Zellen	64
2.9	Proteinbiochemische Methoden.....	65
2.9.1	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)...	65
2.9.1.1	Berechnung des Molekulargewichts.....	66
2.9.2	Westernblot	66
2.9.3	Weitere Proteinnachweismethoden.....	67
2.10	Analyse der scFv-Fc in der konventionellen Durchflusszytometrie	67
2.10.1	Überprüfung von Kreuzreaktivitäten.....	67
2.10.1.1	Auswertungskriterien	68
2.10.2	Trypsinierung.....	68
2.10.3	Internalisierung.....	68
2.11	Analyse der scFv-Fc in der Konfokalmikroskopie.....	69
2.11.1	Internalisierung in Kasumi-1.....	69
2.11.2	Bindung auf AML-Primärzellen.....	70
2.12	Analyse der scFv-Fc in der spektralen Durchflusszytometrie.....	70
2.12.1	Charakterisierung der AML-Primärzellen	70
2.12.1.1	Gatingstrategie	71
2.12.1.2	Auswertungskriterien	72
2.12.2	Charakterisierung gesunder Blutspenderzellen	73
2.12.2.1	Gatingstrategie	73
2.12.2.2	Auswertungskriterien	74
Ergebnisse.....	75

3.1	Literaturrecherche und Aufstellung der PD-Strategien.....	75
3.2	Bestimmung des prozentualen Anteils an Blasten.....	77
3.3	Anreicherungen von Blasten nach immunmagnetischer Separation	77
3.4	Anreicherungen von Monozyten über Adhärenz	78
3.5	Phage Display.....	78
3.5.1	Output- / Input-Titer	78
3.5.2	Phagenbindung auf AML-Primärzellen gemäß polyklonaler Analyse ...	79
3.5.3	Phagenbindung auf AML-Primärzellen und Blutspenderzellen gemäß monoklonaler Analyse.....	80
3.5.4	Phagenbindung auf AML-Primärzellen und Blutspenderzellen gemäß Einzelphagenanalyse.....	82
3.5.5	Zuordnung der aussichtsreichsten sieben Phagen zur PD-Strategie....	83
3.6	Mutagenese	84
3.7	Klonierung in den pMS2-Vektor und Transfektion in HEK293T-Zellen..	85
3.8	Nachweis der hergestellten scFv-Fc	86
3.9	Analyse der scFv-Fc in der konventionellen Durchflusszytometrie	87
3.9.1	Überprüfung von Kreuzreaktivitäten.....	87
3.9.2	Trypsinierung.....	88
3.9.3	Internalisierung.....	89
3.10	Analyse der scFv-Fc in der Konfokalmikroskopie.....	90
3.10.1	Internalisierung in Kasumi-1.....	90
3.10.2	Bindung auf AML-Primärzellen.....	91
3.11	Analyse der scFv-Fc in der spektralen Durchflusszytometrie.....	92
3.11.1	Charakterisierung der AML-Primärzellen	92
3.11.2	Charakterisierung gesunder Blutspenderzellen	93
Diskussion.....		95
4.1	Zielsetzung	95
4.2	Optimierung der PD-Strategie.....	95
4.3	Sequenzauswertungen der selektierten Binder.....	98
4.3.1	Sequenzgleiche Phagen zwischen PD-Strategien	98
4.3.2	Sequenzgleiche CDR zwischen den selektierten scFv	101
4.4	Bindungsverhalten der selektierten scFv-Fc	102

4.4.1	Überprüfung von Kreuzreaktivitäten.....	102
4.4.2	Bindung auf AML-Primärzellen und AML-Zelllinien.....	102
4.4.3	Bindung auf gesunden Blutspenderzellen.....	104
4.5	Internalisierungsverhalten der selektionierten scFv-Fc.....	105
Zusammenfassung		106
5.1	Summary.....	107
Anhang.....		108
6.1	PubMed-Recherche.....	108
6.1.1	Suchdetails.....	108
6.2	Detaillierte Materialaufstellung.....	108
6.2.1	Antibiosen.....	108
6.2.2	Enzyme	109
6.2.3	Kits	109
6.2.4	Molekulargewichtsmarker.....	110
6.2.5	Antikörper	110
6.2.6	Laborgeräte	111
6.2.7	Verbrauchsmaterial und Reagenzien.....	113
6.2.8	Puffer und Lösungen.....	116
6.2.9	Nährmedien und Agar	118
6.2.10	Software	119
6.2.11	Bakterienstämme	119
6.2.12	Zelllinien	119
6.3	Kontrolle der immunmagnetischen Separation (MACS).....	120
6.4	Tabellarische Darstellungen der Output- / Input-Titer.....	121
6.5	Phagenbindung gemäß polyklonaler Analyse	122
6.5.1	Auswertung Patient 0	122
6.5.2	Tabellarische Übersicht aller Patienten.....	123
6.6	Phagenbindung gemäß Einzelphagenanalyse.....	124
6.6.1	Darstellung der Bindung auf Kasumi-1.....	124
6.6.2	Tabellarische Auswertung aller Phagen.....	124
6.7	Basenabfolge / Aminosäuresequenz der scFv-Inserts nach Mutation	125
6.8	Aminosäuresequenzen der scFv-Fc.....	127

6.9	Immobilisierte Metallchelataffinitätschromatographie: His-Tag-Aufreinigung.....	130
6.10	Einengen und Umpufferung der scFv-Fc.....	131
6.11	Überprüfung der His-Tag-Aufreinigung und Einengung.....	131
6.11.1	Ergebnis	132
6.12	Coomassie-Färbung	132
6.12.1	Ergebnis	133
6.13	Massenspektrometrie	133
6.13.1	Ergebnis	134
6.14	Trypsinierung	135
6.14.1	Abnahme der Fluoreszenz mit Dauer der Inkubationszeit	135
6.15	Konfokalmikroskopie.....	136
6.15.1	Internalisierung in Kasumi-1.....	136
6.15.2	Bindung auf AML-Primärzellen.....	136
	Abkürzungsverzeichnis.....	138
	Abbildungsverzeichnis.....	144
	Tabellenverzeichnis.....	146
	Formelverzeichnis	147
	Literaturverzeichnis.....	148
	Danksagung	164
	Publikationsverzeichnis	165

Einleitung

1.1 Akute Myeloische Leukämie

Die Akute Myeloische Leukämie ist eine Neoplasie des blutbildenden Systems, welche unbehandelt im Median nach 17 Wochen zum Tode führt (Southam et al. 1951) (Röllig et al. 2018).

Ihr liegt eine heterogene, aber klonale Expansion myeloischer Vorläuferzellen im Knochenmark, sogenannte Blasten, zugrunde (Saultz und Garzon 2016). Durch Ausschwemmen dieser Zellen aus dem Knochenmark ins periphere Blut erscheint nach Sedimentation auf den zuunterst liegenden roten Blutzellen (Erythrozyten) eine für gesunde Verhältnisse zu dicke Schicht an weißen Zellen des Blutes (Leukozyten).

Aufgrund dieses beobachtbaren Phänomens prägte Rudolf Virchow im Jahre 1845 den Begriff der Leukämie, welcher aus dem Altgriechischen entlehnt „weißes Blut“ bedeutet (Baenkler et al. 2001). Dieses rein deskriptive Merkmal kann sich jedoch auch bei anderen Leukämieformen zeigen, z.B. bei der Akuten Lymphatischen Leukämie (ALL), der Chronischen Lymphatischen Leukämie (CLL) oder der Chronischen Myeloischen Leukämie (CML), wovon letztere vermutlich Virchow zur Begriffsprägung veranlasste (Baenkler et al. 2001).

Alle genannten Leukämiearten unterscheiden sich allerdings grundlegend sowohl in ihrer Pathogenese als auch in ihrer Behandlung, so dass sich nachfolgend allein auf die Darstellung der Akuten Myeloischen Leukämie (AML) fokussiert wird.

1.1.1 Epidemiologie

Die AML ist mit vier Erkrankungen je 100.000 Einwohnern pro Jahr (Berger et al. 2017) die häufigste akute Leukämie des Erwachsenen (Schiffer und Gurbuxani 2017b) (Herold 2018). Diese Inzidenz steigt mit höherem Lebensalter an, so dass die Neuerkrankungsrate pro Jahr in der Altersgruppe der über 70-Jährigen bei mehr als 20 Fällen je 100.000 Einwohnern liegt (Berger et al. 2017). Das mediane Erkrankungsalter beträgt circa 70 Jahre (Berger et al. 2017), wobei Männer häufiger betroffen sind als Frauen (σ : ♀ -Ratio entspricht circa 5 : 3) (Schiffer und Gurbuxani 2017b). Ihr prozentualer Anteil an allen malignen Neubildungen beläuft sich dabei zwar nur auf 1 – 2 %, doch ist sie die zwischen der 3. und 4. Lebensdekade am häufigsten tödlich verlaufende Neoplasie des Menschen (Berger et al. 2017).

1.1.2 Pathogenese

Für die Pathogenese der AML ist das Verständnis des hierarchischen Aufbaus der gesunden Blutbildung (Hämatopoese) essentiell. So produziert das Knochenmark eines 70 kg schweren Menschen ca. eine Millionen ausgereifte Blutzellen pro Sekunde (Seita und Weissman 2010), wobei all diese Zellen nur auf eine kleine Fraktion an Zellen des hämatopoetischen Systems im Knochenmark zurückzuführen sind, den multipotenten hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) (Ogawa 1993) (Seita und Weissman 2010).

Diese HSCs zeichnen sich insbesondere durch zwei Eigenschaften aus: Selbsterneuerung und Differenzierung (Seita und Weissman 2010). Selbsterneuerung beschreibt hierbei ihre Fähigkeit, neue HSCs hervorzubringen, die ihrerseits vollkommen undifferenziert und damit ein Ebenbild ihrer Vorgängerzellen sind. Differenzierung beschreibt demgegenüber, Nachfolgezellen hervorzubringen, sog. Progenitoren, welche determiniert und damit fähig sind, sich in alle ausgereiften (terminal differenzierten) Zellen des Blutes weiterzuentwickeln, wodurch das humane Blutsystem etabliert wird (Seita und Weissman 2010).

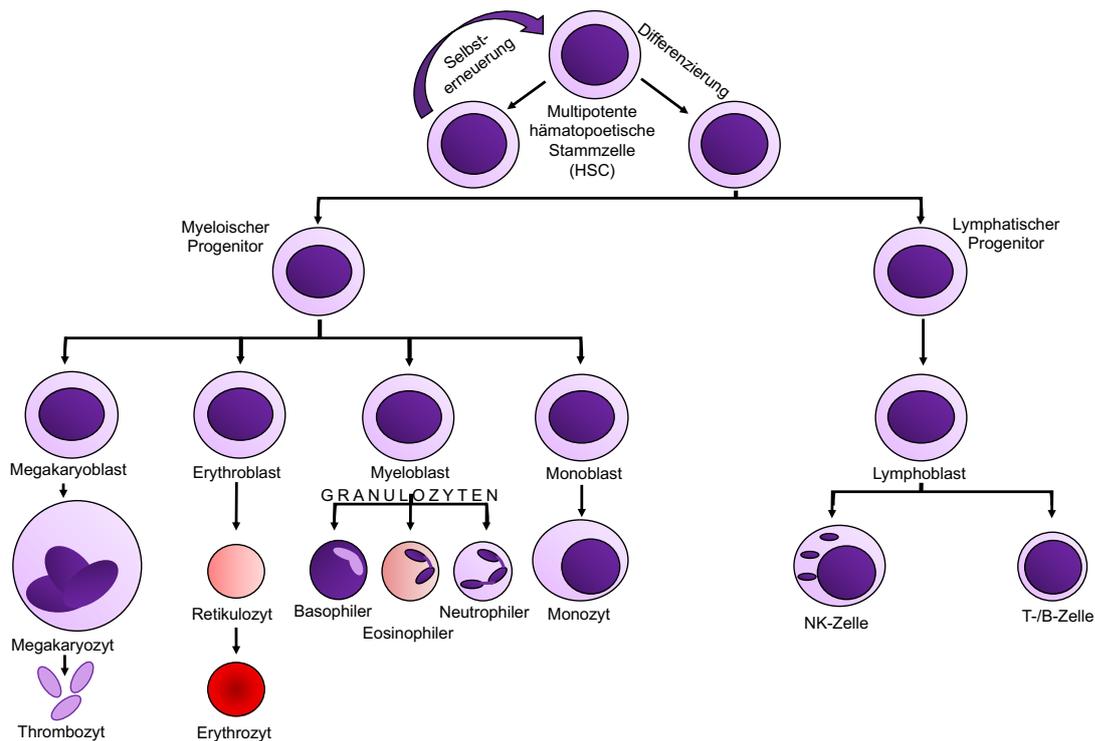


Abbildung 1: Menschliche Hämatopoese

Dargestellt ist die humane Blutbildung beginnend mit der multipotenten hämatopoetischen Stammzelle (HSC), die Ursprung sowohl der myeloischen Linie als auch der lymphatischen Blutzelllinie ist. Ihre Fähigkeit zur gleichzeitigen Differenzierung und Selbsterneuerung unterscheidet die HSC von allen nachfolgenden Zellen. – Vorliegende Abbildung ist angelehnt an eine über Creative Commons Attribution 3.0 International License lizenzierte Abbildung, welche unter <http://cnx.org/contents/019f4238-3211-49d3-8a7f-55a57e8ddca4@5> (OpenStax 2013), Zugriff: 23.09.2018, 9:37 Uhr, einzusehen ist. Von der entlehnten Abbildung abweichende Veränderungen: Bezeichnungen / Untertitel sind abgewandelt, z.T. verkürzt und verändert, zudem aus dem Englischen ins Deutsche übersetzt.

Das Blutsystem besteht dabei aus zwei großen Reifungslinien, d.h. zum einen der lymphatischen und zum anderen der myeloischen Linie. Zur lymphatischen Reihe zählen die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und die Zellen der erworbenen Immunität, d.h. die T- und die B-Lymphozyten. Letztere sind dabei - insbesondere in ihrer reiferen Form als Plasmazellen - die Produzenten der humoralen Immunität, somit der im Blutplasma zirkulierenden Antikörper (Berger et al. 2017).

Die für das Verständnis der AML jedoch wichtigste Linie ist die der myeloischen Zellen. Hierunter zählen neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten, zudem Erythrozyten, Monozyten und Megakaryozyten, aus welchen sich die Blutplättchen (Thrombozyten) abschnüren (Kiefel und Mueller-Eckhardt 2010) (Berger et al. 2017) sowie all ihre Vorläuferzellen (OpenStax 2013).

Eine AML entwickelt sich, indem die Differenzierung einer dieser HSCs oder myeloischen Progenitoren auf irgendeiner Stufe zur terminalen Ausreifung scheitert (Klasse-II-Mutation) (Reilly 2005), die Proliferation der Zelle aber weiter anhält respektive sich verstärkt (Klasse-I-Mutation) (Stock und Thirman 2017) (Bonnet 2005). Hierdurch kommt das normalerweise durch Wachstums- und Transkriptionsfaktoren stark regulierte System der Hämatopoese aus seinem Gleichgewicht (Stock und Thirman 2017). Der unausgereifte, hochproliferierende AML-Klon mit der erhaltenen oder erworbenen Fähigkeit zur Selbsterneuerung (Stock und Thirman 2017) nimmt überhand und überwuchert das restliche gesunde blutbildende System des Knochenmarks, so dass letztlich das klinische Bild der Knochenmarksinsuffizienz resultiert (Bonnet 2005) (Röllig et al. 2018) (Stock und Thirman 2017).

Der Prozess der Akquisition von denjenigen Mutationen, die final zur malignen Entartung mit hämatopoetischer Insuffizienz führen, ist dabei geprägt durch eine subklinische Latenz (Shlush und Mitchell 2015). Je länger diese Latenzzeit, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass der initial entartete Klon bereits mehrere Folgeklone gebildet hat (Röllig et al. 2018), die sich letztlich in Art und Anzahl ihrer Mutationslast von jenem unterscheiden (Shlush und Mitchell 2015). Dies führt zu einer nicht zu unterschätzenden Heterogenität der Gesamtheit aller AML formierenden Zellen, den sogenannten Blasten (Röllig et al. 2018).

Diese klonale Evolution (Ding et al. 2012) innerhalb einer einzigen AML macht deren Therapie somit äußerst komplex und schwierig, da die gewählte Behandlung ggf. nicht für alle Leukämiezellen gleiche Wirkung entfalten kann (Röllig et al. 2018). Zudem besteht die Gefahr, durch Medikamentenapplikation einen Selektionsdruck auszuüben, so dass nach erfolgter Therapie resistente Zellklone fortbestehen oder alternativ durch die Therapie induziert neue, resistente Klone entstehen (Ding et al. 2012).

Von diesen so selektionierten Zellen kann nachfolgend ein Rezidiv, d.h. die Wiederkehr der AML (Bibliographisches Institut GmbH 2018) nach initialer Remission (Verschwinden aller Krankheitszeichen und Symptome (Southam et al. 1951)), ausgehen (Shlush und Mitchell 2015) (Ding et al. 2012).

1.1.3 Klinik

Die klinische Präsentation eines AML-Erkrankten ist hauptsächlich durch die hämatopoetische Insuffizienz in Form einer variablen Ausprägung von Anämie, Neutropenie und Thrombozytopenie bestimmt (Schiffer und Gurbuxani 2017b) (Schiffer und Gurbuxani 2017a).

Durch die Blutarmut leidet der Patient u.a. an generalisierter Müdigkeit und Schwäche (Röllig et al. 2018). Durch die Neutropenie, d.h. die Verminderung der neutrophilen Granulozyten und die damit einhergehende immunologische Inkompetenz, treten vermehrt - insbesondere bakterielle - Infektionen auf (Röllig et al. 2018). Durch die Verminderung der Blutplättchen (Thrombozyten) entstehen Blutungskomplikationen wie Petechien (punktförmige Hauteinblutungen (Moll et al. 2005)), Ekchymosen (großflächige Hauteinblutungen (Moll et al. 2005)) und Epistaxis (Nasenbluten (Strutz und Arndt 2001)) (Röllig et al. 2018).

Insbesondere bei der AML FAB M3 (Akute Promyelozytenleukämie, APL) sind Blutungen und Gerinnungsstörungen krankheitsbestimmend (Lengfelder et al. 2018). Da die Promyelozytenleukämie jedoch eine sehr spezielle Entität innerhalb der AML darstellt, welche sich in ihrer Behandlung mit u.a. All-trans-Retinsäure (ATRA) und besonders in ihrer günstigen Prognose (Langzeitüberleben von über 75 %) von allen anderen diagnostizierten AML unterscheidet (Lengfelder et al. 2018), wird die AML FAB M3 in vorliegender Arbeit nicht näher ausgeführt.

1.1.4 Diagnosekriterien

Ein myeloischer Blastenanteil von $\geq 20\%$ im Knochenmark und / oder im peripheren Blut ist die diagnostische Definition einer AML (Röllig et al. 2018) (Berger et al. 2017). Zusätzliche Untersuchungen zur Diagnosesicherung bestehen gemäß der DGHO-Leitlinien von 2018 (Röllig et al. 2018) und 2019 (Röllig et al. 2019) aus: Anamnese und körperlichem Untersuchungsbefund, Blutbild und Differenzialblutbild, Knochenmarkbiopsie / -zytologie / -zytochemie, Zytogenetik (ggf. FISH, fluorescence in situ hybridisation), Immunphänotypisierung (FACS, siehe 2.6.4), Molekulargenetik bzgl. Mutationen und Genumlagerungen.

Unabhängig vom Blastenanteil, aber dennoch beweisend für eine AML, sind zudem der Nachweis eines Myelosarkoms (Jaffe 2011) (d.h. einer tumorartigen, extramedullären

Proliferation myeloischer Blasten) oder folgende genetische Aberrationen (Schiffer und Gurbuxani 2017b):

- t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1
- inv(16)(p13.1;q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); CBFB-MYH11
- t(15;17)(q24.1;q21.2); PML-RARA

Letztere Translokation beweist eine APL. Die Promyelozytenleukämie wird jedoch, wie bereits erwähnt, nicht näher erörtert.

1.1.5 WHO-Klassifikation (2016)

Unter Berücksichtigung des stetig wachsenden Verständnisses des molekularen Bedingungsgefüges für die Entstehung einer AML hat die World Health Organization (WHO) im Jahr 2016 eine überarbeitete Klassifikation der AML herausgegeben (Arber et al. 2016).

Gemäß dieser aktuellen WHO-Klassifikation wird die AML anhand der Zellmorphologie, des Immunphänotyps, der Genetik und des klinischen Erscheinungsbildes in Hauptgruppen untergliedert (Schiffer und Gurbuxani 2017a). Dieses trägt der Heterogenität der Erkrankung Rechnung, wobei gleichzeitig die Hoffnung auf zukünftige zielgerichtete Therapien durch besseres Verständnis der Treibermutationen und damit angreifbaren Pathways ersichtlich wird. Tabelle 1 zeigt die überarbeitete Version der WHO-Klassifikation (angelehnt an (Berger et al. 2017), (Röllig et al. 2018) und (Honecker et al. 2020)).

1.1.5.1 FAB-Klassifikation (1985)

Die AML-Klassifikation der French-American-British Cooperative Group (FAB-Klassifikation) stellt einen Vorläufer der WHO-Klassifikation dar (Röllig et al. 2018). Sie beruht vorwiegend auf morphologischen und zytochemischen Eigenschaften (Berger et al. 2017).

Zu Beginn dieser Arbeit wurde die FAB-Klassifikation im klinischen Alltag stets parallel zur WHO-Klassifikation für jeden Patienten bestimmt und letztlich auch zur Auswertung in dieser Dissertation herangezogen (siehe 4.4.2), weshalb sie in Tabelle 2 angeführt sei (angelehnt an (Berger et al. 2017)).

In ihren Grundzügen findet sich die FAB-Klassifikation unter der WHO-Kategorie „AML, nicht anderweitig klassifiziert“ wieder.

Hauptgruppe	Genauere Angaben
AML mit rekurrenten genetischen Aberrationen	AML mit t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1
	AML mit inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11
	APL mit t(15;17)(q22;q12); PML-RARA
	AML mit t(9;11)(p22;q23); MLLT3-KMT2A
	AML mit t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214
	AML mit inv(3)(q21;q26.2) oder t(3;3)(q21;q26.2); GATA2, MECOM
	AML (megakaryoblastisch) mit t(1;22)(p13;q13); RBM15-MKL1
	AML mit mutiertem NPM1
	AML mit biallelischer Mutation von CEBPA
	Provisorische Entität: AML mit BCR-ABL1
	Provisorische Entität: AML mit mutiertem RUNX1
AML mit Myelodysplasie- verwandten Veränderungen	
Therapiebedingte myeloische Neoplasien	
AML, nicht anderweitig klassifiziert	AML mit minimaler Differenzierung (M0)
	AML ohne Ausreifung (M1)
	AML mit Ausreifung (M2)
	Akute myelomonozytäre Leukämie (M4)
	Akute Monoblasten- / Monozytenleukämie (M5)
	Reine Erythroleukämie (M6)
	Erythroleukämie, erythroid / myeloisch
	Akute Megakaryoblastenleukämie (M7)
	Akute Basophilenleukämie
	Akute Panmyelose mit Myelofibrose
Myelosarkom (syn. Chlorom)	
Myeloische Proliferation bei Down-Syndrom (Trisomie 21)	Transiente abnorme Myelopoese
	Myeloische Leukämie bei Trisomie 21
Akute Leukämie unklarer Linienzugehörigkeit	Akute undifferenzierte Leukämie
	Akute Leukämie mit gemischtem Phänotyp mit t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1
	Akute Leukämie mit gemischtem Phänotyp mit t(v;11q23.3); MLL / KMT2A rearrangiert
	Akute Leukämie mit gemischtem Phänotyp, B / myeloisch, NOS
	Akute Leukämie mit gemischtem Phänotyp, T / myeloisch, NOS

Tabelle 1: WHO-Klassifikation (2016)

Dargestellt ist die Einteilung der AML gemäß neuester WHO-Klassifikation anhand immunphänotypischer, zyto- und molekulargenetischer Kriterien. Abkürzungen: t – Translokation; inv – Inversionen;

FAB	Morphologie und Charakteristika	Zytochemie			Immunphänotyp*	Häufigkeit
		Myeloperoxidase	Esterase	Perjodsäure-Schiff-Reaktion		
M0	Akute undifferenzierte Leukämie	< 3 %	-	-	Myeloisch	< 2 %
M1	Akute unreife Myeloblastenleukämie	3 - 10 %	-	-		20 %
M2	Akute Myeloblastenleukämie mit Ausreifung	> 30 %	-	-		30 %
M3	Akute Promyelozytenleukämie, APL	+++	-	- / +	HLA-DR	10 %
M4	Akute myelomonozytäre Leukämie	+	+	-		30 %
M5	Akute Monoblastenleukämie	+ / -	+	- / +		10 %
M6	Akute Erythro-leukämie	-	-	+ / -	Glycophorin +	< 5 %
M7	Akute Megakaryoblastenleukämie	-	-	+ / -	CD61 + CD41 +	< 5 %

Tabelle 2: FAB-Klassifikation (1985)

Abgebildet ist die ehemals klinisch gebräuchliche Einteilung der AML anhand zytomorphologischer und -chemischer Kriterien, die FAB-Klassifikation der French-American-British Cooperative Group. – Anmerkungen bzgl. des Immunphänotyps: * (mind. ≥ 2 der folgenden Marker sind positiv: Myeloperoxidase, CD13, CD33, CD65, CD117), i.d.R. besteht keine strenge Korrelation zwischen FAB-Klassifikation und Immunphänotyp (Berger et al. 2017). „+“ – positiv; „-“ – negativ; CD – cluster of differentiation;

1.1.6 Risikogruppen gemäß European LeukemiaNet (ELN 2017)

Anhand molekularer und zytogenetischer Aberrationen wird die AML gemäß der Stratifikation des European LeukemiaNet aus 2017 (Döhner et al. 2017) in drei Risikogruppen unterteilt (siehe Tabelle 3, entnommen aus bzw. angelehnt an (Röllig et al. 2019)). Diese Risikogruppen zeigen prognostische Relevanz (Röllig et al. 2019) und haben therapeutische Bedeutung (siehe 1.1.7).

ELN-Risikogruppe	Aberrationen
Günstig	t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1
	inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11
	Mutiertes NPM1 ohne FLT3-ITD oder mit FLT3-ITD ^{niedrig*}
	Biallelisch mutiertes CEBPA
Intermediär	Mutiertes NPM1 mit FLT3-ITD ^{hoch*}
	Wildtyp-NPM1 ohne FLT3-ITD (normaler Karyotyp) oder mit FLT3-ITD ^{niedrig*} (ohne ungünstige genetische Aberrationen)
	t(9;11)(p22;q23); MLLT3-KMT2A ¹
	Zytogenetische Aberrationen, die nicht als günstig oder ungünstig eingestuft wurden
Ungünstig	t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214
	t(v;11)(v;q23); KMT2A-Genumlagerung
	t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1
	inv(3)(q21q26.2) oder t(3;3)(q21;q26.2); GATA2, MECOM (EVI1)
	-5 oder del(5q); -7; -17 / abnl(17p)
	komplexer Karyotyp (≥ 3 Aberrationen) ²
	monosomaler Karyotyp (eine Monosomie, assoziiert mit mindestens einer weiteren Monosomie oder einer anderen strukturellen, chromosomalen Aberration (außer CBF-AML))
	Wildtyp-NPM1 mit FLT3-ITD ^{hoch*}
	Mutiertes RUNX1 ³
	Mutiertes ASXL1 ³
	Mutiertes TP53

Tabelle 3: Risikogruppen gemäß ELN 2017

*FLT3-ITD^{niedrig} = Mutant-Wildtyp-Allel-Quotient < 0,5; FLT3-ITD^{hoch} = Mutant-Wildtyp-Allel-Quotient ≥ 0,5

¹in Anwesenheit seltenerer, als ungünstig eingestufte Aberrationen „sticht“ die t(9;11), d.h. sie gibt den Ausschlag für eine Einstufung in die intermediäre Risikogruppe

²nur zutreffend, wenn nicht gleichzeitig eine der WHO-definierten AML-typischen Aberrationen vorliegt (d.h. t(8;21), inv(16) oder t(16;16), t(9;11), t(v;11)(v;q23.3), t(6;9), inv(3) oder t(3;3); AML mit BCR-ABL1)

³nur als ungünstig einzustufen, wenn keine als günstig eingestufte Aberrationen vorliegen, d.h. in Anwesenheit günstiger Veränderungen geben diese den Ausschlag für eine Einstufung in die günstige Risikogruppe

1.1.7 Überblick: Aktueller Stand der Therapie

Erste Remissionen der initial unheilbaren AML konnten mit Etablierung einer Kombinationstherapie bestehend aus dem Anthrazyklin Daunorubicin und dem Nukelosidanalogon Cytosinarabinosid (syn. AraC, Cytarabin) im Jahre 1970 beobachtet werden (Crowther et al. 1970) (Saultz und Garzon 2016). Unter dieser Therapie zeigen Patienten unter 60 Jahren mit 35 – 40 % ein Langzeitüberleben (Saultz und Garzon 2016). Patienten über 60 Jahren erzielen indessen nur Heilungsraten von 5 – 10 % (Döhner et al. 2015), welches insbesondere durch etwaige Komorbiditäten bedingt ist, die häufig die Applikation ausreichend hoher Medikamentendosen verhindern (Medinger et al. 2016).

Das allgemeine Therapieregime der AML besteht insgesamt aus zwei Anteilen: der Induktionstherapie und der Konsolidierung (Röllig et al. 2018).

Der Standard der Induktionstherapie ist das sog. 7 + 3-Regime, wobei sich die Zusammensetzung seit über 40 Jahren nicht verändert hat (Medinger et al. 2016). Hierbei werden dem Patienten eine kontinuierliche Cytarabin-Infusion (100 mg/m^2) über 7 Tage mit zusätzlichem Anthrazyklin an 3 Tagen (i.d.R. Tag 3 – 5 über 2 h (Honecker et al. 2020)) verabreicht (z.B. Daunorubicin [60 oder 90 mg/m^2] (Saultz und Garzon 2016)). Jüngere Patienten unter 60 Jahren sollten hierbei eine Doppelinduktion erhalten (Honecker et al. 2020). Für Patienten über 60 Jahren ist i.d.R. eine einfache Induktionstherapie der Standard (Honecker et al. 2020).

Ziel der Induktionschemotherapie ist es, u.a. eine morphologische komplette Remission (CR) zu erzielen. Diese ist wie folgt definiert (Cheson et al. 2003) (Röllig et al. 2019):

- Blasten im Knochenmark $< 5 \%$
- Abwesenheit von Auerstäbchen und extramedullären Manifestationen
- Neutrophile Granulozyten $\geq 1000 /\mu\text{l}$ und Thrombozyten $\geq 100.000 /\mu\text{l}$
- Keine Blasten im peripheren Blut

Durch das in den letzten Jahren verbesserte molekulare Verständnis konnte der Induktionschemotherapie für alle Patienten mit FLT3-Mutation zudem der FLT3-Inhibitor Midostaurin hinzugefügt werden (Röllig et al. 2018). Dies stellt somit einer der ersten Ansätze zur zielgerichteten Therapie im Rahmen der AML dar (Saultz und Garzon 2016). Auch das im Jahre 2017 – nach anfänglicher Marktrücknahme 2010 (Talati und Sweet 2018) – nun in geringerer Dosierung wiederzugelassene Antikörper-Medikamenten-Konjugat Gemtuzumab-Ozogamicin (GO), gerichtet gegen das Oberflächenmolekül CD33 und gekoppelt mit dem DNA-schädigenden Toxin Calicheamicin (Watts und Nimer 2018), folgt den Grundsätzen der *targeted therapy* im Rahmen der AML bei CD33-Positivität der Blasten (Watts und Nimer 2018).

Zur Konsolidierung nach erreichter CR existieren je nach Risikostratifizierung nach ELN 2017 (siehe 1.1.6) bzw. gemäß der nach Induktionstherapie molekulargenetisch noch nachweisbaren minimalen Resterkrankung (minimal residual disease, MRD) zwei generelle Prinzipien: Chemotherapie (+ / - zielgerichtetes Therapeutikum (Röllig et al. 2019)) und eine hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSCT) (Medinger et al. 2016).

Für jüngere Patienten unter 60 Jahren mit günstigem Risikoprofil gemäß ELN (ggf. inkl. niedrig-negativem MRD-Niveau (Röllig et al. 2019)) ist eine hochdosierte Cytarabin-Therapie (3 g/m^2 über 3 h, mit Wdh. nach 12 h, an den Tagen 1, 3 und 5 für 2 – 4 Zyklen (Honecker et al. 2020)) Standard. Selbiges gilt für ältere Patienten, wobei die Cytarabindosierung auf $500 - 1000 \text{ mg/m}^2$ reduziert werden sollte (Honecker et al.

2020), da eine Hochdosistherapie aufgrund der z.T. irreversiblen Neurotoxizität unangebracht wäre (Saultz und Garzon 2016).

In Hochrisiko- bzw. Intermediärrisiko-Konstellationen wird bei klinisch fitten Patienten nach erreichter erster CR eine allogene HSCT (von einem menschlichen Stammzellspender stammend) angestrebt, welches mit Heilungsraten von 50 – 60 % die effektivste, wenngleich intensivste Prozedur darstellt (Saultz und Garzon 2016). Weiterführende Informationen zur HSCT sind nicht Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit, weshalb an dieser Stelle auf einschlägige Fachliteratur verwiesen wird (Kassim und Savani 2017) (Singh und McGuirk 2016) (Herr und Bader 2015).

1.2 Antikörper

Antikörper (AK) sind Proteine, genauer Immunglobuline (Ig), welche den humoralen Teil der erworbenen Immunität darstellen (Tiller und Tessier 2015). Sie werden initial als membranständige Rezeptoren durch B-Lymphozyten im Knochenmark via Genrekombination gebildet. Nach Erreichen des Status des reifen B-Lymphozyten verlassen diese das Knochenmark und zirkulieren als naive B-Zellen im peripheren Blut und Gewebe auf der Suche nach dem passenden Antigen zu ihrem jeweiligen spezifischen Oberflächenrezeptor (Murphy et al. 2014).

Nach stattgehabtem Antigenkontakt bauen sie ihren Rezeptor in Keimzentren von Lymphfollikeln schließlich derart um, dass eine Affinitätszunahme (i.S.e. Affinitätsreifung) bezüglich des spezifischen Antigens resultiert (Murphy et al. 2014). Es folgt daraufhin die Sekretion des ehemaligen Rezeptors als lösliches Protein durch die B-Zelle. Dieses lösliche Immunglobulin besitzt die Fähigkeit, sein jeweiliges Antigen zu erkennen, zu binden und letztlich durch Interaktion mit Effektorzellen oder -molekülen (z.B. Komplementsystem) aus dem Körper zu eliminieren (Murphy et al. 2014).

Das natürliche System der gezielten Abwehr durch Bindung an ein spezifisches Antigen dient seit nunmehr vielen Jahrzehnten als Vorbild der pharmazeutischen Entwicklung synthetischer AK mit dem Ziel der Heilung von Krankheiten durch Ausnutzen dieser Antikörperspezifitäten (Tiller und Tessier 2015).

Den Startschuss zum Wettlauf zu immer besseren Antikörpern lieferten hierbei Köhler und Milstein mit der ersten Generierung monoklonaler, d.h. von nur einer B-Zelle produzierter Antikörper durch Etablierung der Hybridom-Technik im Jahre 1975 (Köhler und Milstein 1975).

Es folgte daraufhin 1986 in den USA durch die FDA (US Food and Drug Administration) die Zulassung des ersten monoklonalen Antikörpers zur zielgerichteten Therapie, Muromonab-CD3 (auch Orthoclone OKT3) (Leavy 2010), welcher auch heute noch zur Prävention von Abstoßungsreaktionen nach Nierentransplantation verwendet wird (Liu

2014). Seitdem wurden durch die FDA weit über 50 monoklonale AK zugelassen (Kaplon und Reichert 2018), wobei ihre Anzahl stetig steigt.

Dieses Konzept der *targeted therapy* wurde bereits um 1900 durch den Deutschen Paul Ehrlich in Umlauf gebracht. Er besaß die Idee einer magischen Kugel, die Krankheiten erkennen, gesunde Zellen des Körpers aber unangetastet lassen würde (Strebhardt und Ullrich 2008). „[...] [W]ir müssen zielen lernen, chemisch zielen lernen!“, so der Begründer der Chemotherapie Paul Ehrlich im Jahre 1908 bei einem Vortrag vor der Deutschen Chemischen Gesellschaft (Ehrlich 1909).

Die oben beschriebene Entwicklung der Antikörpertherapie steht daher in Analogie zu Ehrlichs magischer Kugel, so dass in nachfolgenden Abschnitten die Charakteristika von AK detailliert beschrieben werden, um deren Anwendung als zielgerichtete Therapie zu begründen.

1.2.1 Aufbau eines Antikörpers

Im menschlichen Körper gibt es fünf verschiedene Klassen von AK bzw. Immunglobulinen (Ig): IgG, IgA, IgM, IgE und IgD (Murphy et al. 2014). Dabei zeigen IgG vier und IgA zwei weitere Subklassen. Diese fünf Klassen unterscheiden sich in ihrer Effektorfunktion, d.h. in ihrer Funktion als Signalauslöser für z.B. andere Zellen, welches insbesondere durch deren Fc-Teil (fragment crystallisable-Teil) bestimmt wird (Murphy et al. 2014).

Der Fc-Teil stellt dabei das untere Ende des Y-förmigen AK dar, indessen die Antigenbindungsstellen die kurzen Arme des Y bilden und als Fab (fragment antigen binding) bezeichnet werden (Ahmad et al. 2012). Diese Teilbezeichnungen resultieren aus den nach proteolytischem Verdau eines AK erhaltenen Fragmenten (Murphy et al. 2014).

Jeder AK besteht dabei aus zwei identischen leichten Ketten (L) und zwei identischen schweren Ketten (H), welche jeweils heterogen gepaart über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Gleichfalls derartig verbunden sind die beiden schweren Ketten, wodurch letztlich die Y-Form erhalten wird (Murphy et al. 2014) (siehe Abbildung 2).

Somit besteht der Fc-Teil eines Antikörpers allein aus Teilen der schweren Ketten. Ein Fab besitzt allerdings sowohl Anteile der leichten wie der schweren Kette und kommt insgesamt zwei Mal im AK vor. Folglich hat jeder AK zwei Antigenbindungsstellen (Paratope) und ist damit als bivalent zu bezeichnen. Die Valenz eines AKs beschreibt i.A. die Anzahl an potentiellen Bindungsstellen für ein spezifisches Antigen innerhalb eines einzigen Antikörpermoleküls (Sauermost und Freudig 1999a).

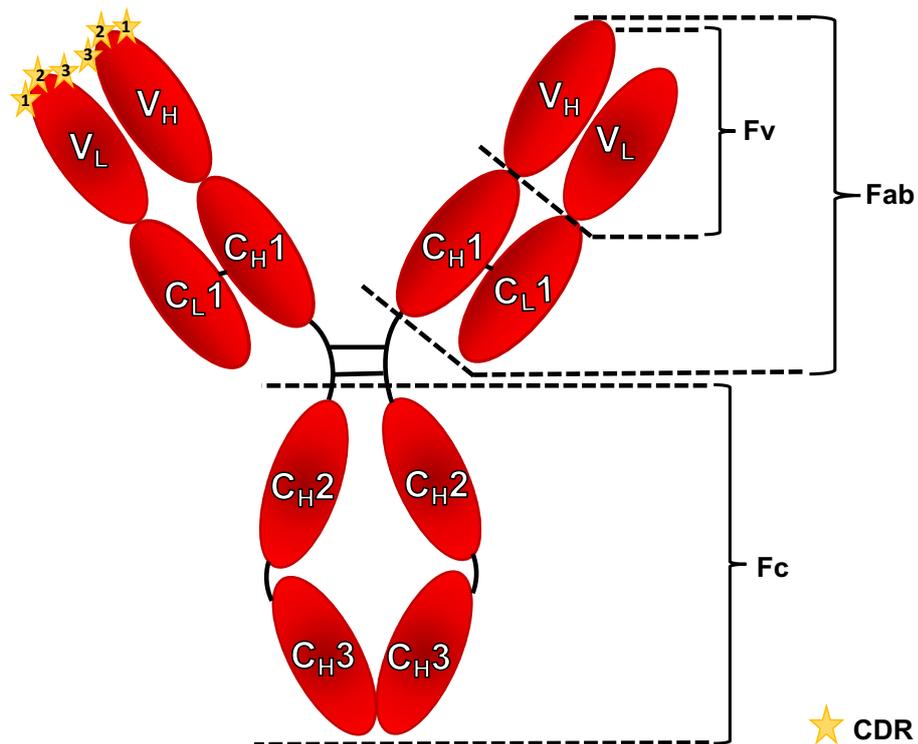


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Antikörpers

Exemplarisch ist das Grundgerüst eines IgG dargestellt. Zu sehen ist das Fc-Fragment (fragment crystallisable), welches aus den konstanten Regionen der beiden schweren Ketten (C_{H2} und C_{H3}) besteht und für die Effektorfunktionen *in vivo* verantwortlich ist. Darauf folgend ist die Gelenkregion des Antikörpers zu sehen, welche in die beiden Fab-Fragmente überleitet. Diese Fab (fragment antigen binding) bestehen aus einer konstanten Region sowohl der leichten (C_{L1}) als auch der schweren (C_{H1}) Kette sowie den beiden variablen Domänen beider Ketten (V_H und V_L). Diese beiden variablen Domänen sind verantwortlich für die Antigenbindung, wobei insbesondere die CDR (complementarity determining regions), hier dargestellt als Sterne, hervorzuheben sind. Innerhalb jeder variablen Domäne existieren drei von diesen CDR. Sie zeichnen sich durch extreme Sequenzvarianz aus und determinieren die Bindung zum Antigen maßgeblich. Die beiden variablen Domänen V_H und V_L, welche gemeinsam auch als Fv (fragment variable) bezeichnet werden, lassen sich mithilfe eines Peptidlinkers verbinden, wodurch das in dieser Arbeit besonders relevante Antikörperformat des scFv (single-chain fragment variable) entsteht.

Jede der schweren Ketten besteht des Weiteren aus vier Unterdomänen, wovon drei hochkonserviert und innerhalb einer Immunglobulinklasse gleichartig gestaltet sind. Diese werden mit den Begriffen C_{H1} - 3 (heavy chain constant domain 1 - 3) betitelt. Die letzte Unterdomäne ist allerdings innerhalb derselben AK-Klasse hochdivers und wird daher mit V_H (heavy chain variable domain) bezeichnet (Murphy et al. 2014).

Innerhalb dieser V_H gibt es zusätzlich drei Regionen, in denen die Variabilität noch sehr viel stärker ausgebildet ist als in den restlichen Anteilen von V_H. Diese drei Bereiche werden daher als hypervariable oder komplementaritätsbestimmende Regionen (complementarity determining regions, CDR1 - 3) bezeichnet. Sie sind, wie der Name bereits vermuten lässt, komplementär zum Antigen und definieren somit mögliche Antigenbindungen. Hierzu im Kontrast beschreibt man die etwas geringer variablen Regionen der V_H als Gerüstregionen (framework regions FR1 - 3) (Murphy et al. 2014).

Gleiches Prinzip der Nomenklatur hat Gültigkeit für die Betitelung der leichten Kette. Zu beachten ist allerdings, dass zwei Arten der leichten Kette im Genom des Menschen codiert sind, nämlich die Subtypen κ und λ (Weisser und Hall 2009). Eine leichte Kette besitzt zudem nur eine einzige konstante (C_L1) und eine einzige variable Region (V_L). Ansonsten können die Bezeichnungen für die CDR und FR von V_H analog auf V_L übertragen werden (Murphy et al. 2014).

Die CDR beider Ketten determinieren somit die zielgerichtete Funktion eines AK, wobei die Zusammenarbeit aller sechs CDR erst eine Antigenbindung ermöglicht (Murphy et al. 2014). Dabei ist jedoch eine Varianz ihres Beitrages zur Antigenbindung zu erkennen. So sind die CDR2 und CDR3 der schweren Kette (HCDR2, HCDR3) und die CDR2-Region der leichten Kette (LCDR2) die stärksten Bindungsstellen für das Antigen (Wilson und Stanfield 1994). Insbesondere hervorzuheben ist dabei die HCDR3, da diese die größte Variabilität in Länge, Sequenz und Konformation zeigt (Wilson und Stanfield 1994).

1.2.2 Single-chain fragment variable (scFv)

Wie bereits angeführt, lassen sich ganze Antikörpermoleküle durch proteolytische Spaltung via Papain (Porter 1959) oder Pepsin (Murphy et al. 2014) in drei respektive zwei Fragmente zerlegen. Hierdurch inspiriert wurden Methoden entwickelt, Antikörper auf noch kleinere, aber voll funktionstüchtige Fragmente zu reduzieren.

Aus diesen Bestrebungen resultierte letztlich die Generierung des *single-chain fragment variable* (scFv), der kleinsten funktionellen Domäne, die noch fähig ist, ein Antigen zu binden (Weisser und Hall 2009).

Dieses scFv setzt sich zusammen aus der variablen Domäne der schweren und der leichten Kette, d.h. aus V_H und V_L des AK (siehe Abbildung 3). Ohne zusätzlichen Linker wären diese beiden Domänen sehr instabil, weshalb sie durch eine einzelne Peptidkette, der sog. *single-chain*, am häufigsten bestehend aus der Aminosäuresequenz (GGGGS)₃ (Weisser und Hall 2009), kovalent fusioniert und damit stabilisiert werden (Shen et al. 2008).

Dieses scFv ist somit ein monovalentes Fragment zur Antigenbindung, was zugleich sein entscheidender Nachteil ist (Weisser und Hall 2009). Hierfür seien zunächst die Begriffe Affinität und Avidität eines Antikörpers erörtert.

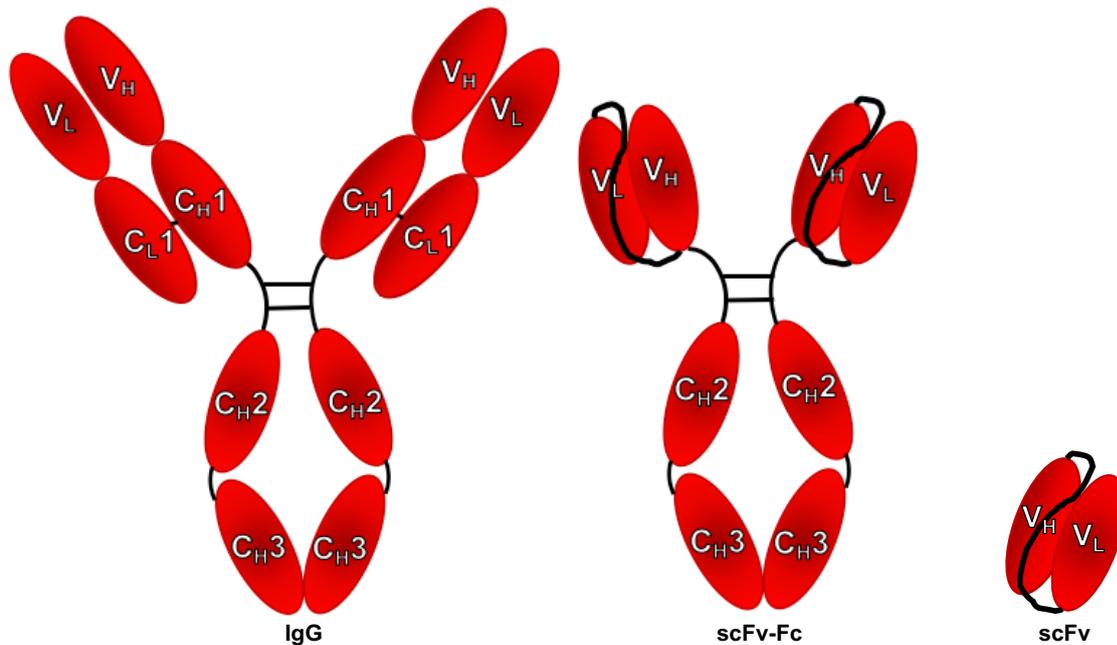


Abbildung 3: Antikörperformate

Dargestellt sind die in dieser Dissertation verwendeten Antikörperformate scFv (single-chain fragment variable) sowie scFv-Fc-Minibody (scFv-Fc) im Vergleich zu einem schematisierten ganzen Antikörper, hier IgG. Wie zu sehen ist, besteht das scFv allein aus den beiden variablen Domänen V_H und V_L eines gesamten Antikörpermoleküls, welche über eine Linkersequenz (kurze Peptidkette, single-chain) stabilisiert werden. Dieser monovalente scFv kann nun via Klonierung an ein Fc-Fragment, welches allein aus den konstanten Regionen der beiden schweren Ketten (C_H2 und C_H3) besteht, als bivalentes Antikörperfragment-Fusionsprotein exprimiert werden, so dass dessen Avidität steigt. Für Erörterungen bzgl. der hier verwendeten Abkürzungen sei auf die Beschreibung zur Abbildung 2 verwiesen.

Die Affinität eines AK beschreibt seine Bindungsstärke an einer einzigen Antigenbindungsstelle, die, wie oben erörtert, durch Kooperation von V_H und V_L gebildet wird. Diese Affinität gemeinsam mit der Valenz (Anzahl an Antigenbindungsstellen pro Antikörpermolekül) bestimmt die Avidität, d.h. die Gesamtbindungsstärke des jeweiligen AK. Exakt formuliert, beschreibt die Avidität daher die Affinität multipliziert mit der Valenz eines gegebenen Antikörpermoleküls (Siegenthaler und Amann-Vesti 2006).

Bedingt durch die Monovalenz eines scFv wird dieser daher bei gegebener Affinität seiner Antigenbindungsstelle stets einen Nachteil gegenüber natürlichen Antikörpern haben, da diese i.A. mindestens bivalent exprimiert werden und damit eine höhere Avidität besitzen (Weisser und Hall 2009).

Einen Ausweg aus dieser Misere stellen scFv-Fusionsprodukte dar. So lassen sich scFv z.B. an ein Fc-Fragment eines Antikörpers klonieren, welches auch im Verlauf dieser Dissertation mithilfe des pMS2-Vektors durchgeführt wurde. Hierdurch entsteht ein scFv-Fc-Minibody (scFv-Fc) und damit ein Fusionsprotein, welches zwei Antigenbindungsstellen durch Homodimerisierung besitzt (Moutel et al. 2009) (Weisser und Hall 2009) (vgl. Abbildung 3). Gleichfalls kann durch diese Klonierung die

Effektorfunktion des Fc-Fragmentes bei etwaigem Einsatz des Antikörpers in vivo oder zur experimentellen Detektion des AK genutzt werden (Weisser und Hall 2009).

Ein großer Vorteil der scFv ist deren unkompliziertere Herstellung in Prokaryoten im Vergleich zu größeren Antikörpermolekülen (King 1998). Fc-Regionen größerer Antikörper sind zudem i.d.R. glykosyliert (Murphy et al. 2014), wobei die variablen Regionen nur zu 10 % N-glykosyliert und entsprechend mit dem N-Glykosylierungssignal N-X-S/T ausgestattet sind (Jacquemin 2010). E. coli-Bakterien sind allerdings nicht in der Lage, diese Glykosylierungen in ihrem Syntheseapparat durchzuführen, so dass für gewünschte Zuckermodifikationen andere Expressionssysteme wie Eukaryoten gewählt werden müssen, wie auch im Verlauf dieser Dissertation geschehen (siehe 2.8.10) (Weisser und Hall 2009).

Mit steigender Größe der Antikörperfragmente bis hin zu ganzen AK sind zudem immer komplexere Proteinfaltungen essentiell, die eine zeitintensive Zellkulturtechnik notwendig werden lassen (Ahmad et al. 2012).

ScFv sind jedoch i.d.R. weder glykosyliert noch von komplexer Struktur, so dass eine adäquate Faltung der Proteine, erleichtert durch Sekretion ins Periplasma der Bakterien (d.h. in den Raum zwischen den beiden Zellmembranen eines Bakteriums mit oxidierendem Millieu (Wink 2011), welches u.a. die Bildung von Disulfidbrücken unterstützt sowie Proteinfaltungsfaktoren, z.B. Chaperone, bereitstellt (Gressner und Arndt 2018) (Ow et al. 2010)), erzielt (Weisser und Hall 2009) und damit die Expression im prokaryotischen System wie im Rahmen des Phage Displays (1.3) problemlos ermöglicht werden kann (Weisser und Hall 2009).

1.3 Phage Display

Die Technik des Phage Displays (PD) wurde 1985 von George P. Smith zum ersten Mal beschrieben (Smith 1985), wofür er gemeinsam mit Sir Gregory „Greg“ P. Winter im Jahr 2018 den Nobelpreis für Chemie erhielt (The Nobel Foundation 2018a) (The Nobel Foundation 2018b).

In seinem 1985 erschienenen Ursprungsartikel „*Filamentous Fusion Phage: Novel Expression Vectors That Display Cloned Antigens on the Virion Surface*“ (Smith 1985) berichtet er von einer neuartigen Technik auf Grundlage filamentöser, Bakterien infizierender Viren (Phagen), deren Besonderheit ihre direkte Koppelung von Genotyp mit Phänotyp darstelle.

So sei jedes Protein, welches auf der einzelsträngigen DNA (ssDNA) des Phagens codiert wäre, auf dessen Oberfläche wiederzufinden. Durch Klonierung einer fremden proteincodierenden DNA-Basensequenz in direkte Nachbarschaft zu einem phageneigenen Hüllprotein, z.B. das Protein pIII, müsste dieser *fusion phage* das

klonierte Peptid auf der Oberfläche präsentieren. Die Herstellung einer Bibliothek dieser Fusionsphagen würde die Erforschung fremder Peptide in nativer Konfiguration ungehindert ermöglichen, so Smiths Vision (Smith 1985).

Die Idee des Phage Displays, also der Präsentation fremder Proteine auf der Oberfläche eines Bakteriophagen, war damit geboren und wurde nur wenige Jahre später durch John McCafferty und Greg Winter *et al.* (McCafferty *et al.* 1990) wieder aufgegriffen und in der Weise weiterentwickelt, wie sie in vorliegender Arbeit gleichfalls Anwendung findet.

Wie Smith hatten nämlich auch McCafferty und Winter das Potential des Phage Displays erkannt und schlugen ihrerseits vor, eine Phagenbibliothek zu generieren, welche die variablen Domänen menschlicher Antikörper inklusive eines Linker-Peptids, somit ein scFv (siehe 1.2.2), präsentieren sollte (McCafferty *et al.* 1990). Diese scFv-Phagenbibliothek könnte dabei synthetisch hergestellt und derart divers gestaltet werden, dass neue hochaffine Antikörper gefunden werden würden (McCafferty *et al.* 1990).

Auf diesen Überlegungen gründet eine der Ideen vorliegender Arbeit.

1.3.1 Biologie der Phagen

Bakteriophagen sind Viren, welche ausschließlich Bakterien infizieren (Navarro und Muniesa 2017). Gemäß der Definition eines Virus kann auch ein Phage sich nur vermehren, wenn er sich den Proteinbiosyntheseapparat eines Wirtes, hier eines Prokaryoten, zu eigen macht (F. H. Kayser *et al.* 2014). Für vorliegende Arbeit wurde der Phage M13 verwendet.

M13 zählt neben den Phagen f1 und fd zu den sogenannten Ff-Phagen, da sie zum einen von filamentöser, fadenartiger Form und zum anderen für die Infektion auf ein F-Pilus tragendes Bakterium angewiesen sind (Tikunova und Morozova 2009). F-Pili werden insbesondere von gram-negativen Bakterien exprimiert (Y. A. Wang *et al.* 2009) und dienen dem horizontalen Gentransfer unter Bakterien wie z.B. *E. coli* (Costa *et al.* 2016).

Die Wahrscheinlichkeit der Infektion eines Phagens über besagten F-Pilus ist dabei im Bereich des logarithmischen Wachstums der Bakterien sowie bei Temperaturen über 34 °C am höchsten (Clackson und Lowman 2004).

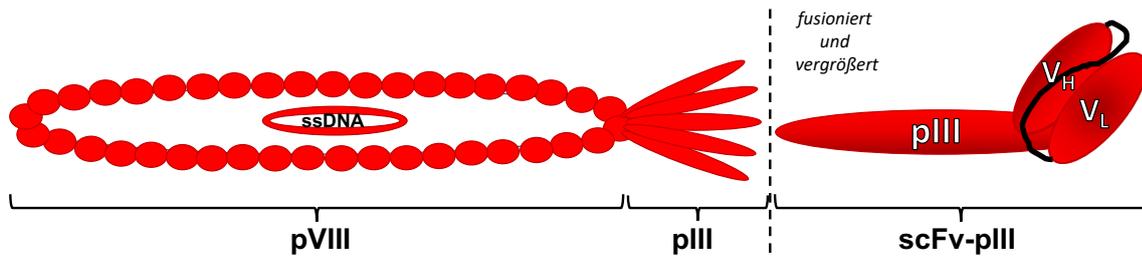


Abbildung 4: Filamentöser Phage

Diese schematische Darstellung eines nativen filamentösen Phagens (links) mit einzelsträngigem Genom (ssDNA) zeigt zum einen das Major-coat-Protein pVIII, welches in 2700 Kopien dessen zylindrischen Corpus bildet. Zum anderen sind an der Spitze des Phagens fünf Minor-coat-Proteine dargestellt. Diese pIII-Proteine sind mit ihren N-terminalen Regionen sowohl für die Infektion von Prokaryoten als auch für die Prävention einer Superinfektion mit einem weiteren Phagen nach erfolgreichem Eindringen in das Bakterium zuständig. Diese nativen pIII-Proteine sind in der Tomlinson J-Bibliothek (siehe 1.3.3) mit einem scFv (siehe 1.2.2) fusioniert worden, wodurch das Hybridprotein scFv-pIII für die Selektionen zur Verfügung steht. Dieses Fusionsprotein ist in der Abbildung rechts schematisch vergrößert abgebildet.

Die Infektion des Bakteriums wird durch das Phagenprotein pIII bzw. durch dessen N-terminale Domäne eingeleitet (Smith und Petrenko 1997). Dieses Protein ist zu maximal fünf Kopien an einem der Enden des filamentösen Phagen exprimiert. Es ist codiert auf einem einzelsträngigen DNA-Phagengenom (ssDNA), welches für zehn zusätzliche Phagenproteine codiert und im Inneren des Phagencorpus zu finden ist (Barbas III et al. 2004) (siehe Abbildung 4).

Fünf dieser auf dem Genom codierten Proteine stellen Hüllproteine dar, so dass sie alle potentiell für den Phage Display Verwendung finden könnten. Dennoch werden hauptsächlich das *major-coat*-Protein, pVIII, welches mit 2700 Kopien den Hauptanteil des Phagenzylinders darstellt (Ebrahimizadeh und Rajabibazl 2014), und eines der *minor-coat*-Proteine, genauer das Protein pIII, angewendet (Tikunova und Morozova 2009).

pIII ist dabei nicht nur dasjenige Protein, welches die Infektion eines Bakteriums einleitet (Barbas III et al. 2004), sondern auch dasjenige, welches nach erfolgreicher Infektion mithilfe seiner N-terminalen Domäne eine Superinfektion mit einem weiteren Bakteriophagen verhindert (Gao et al. 2002) (Smith und Petrenko 1997). So wird sichergestellt, dass pro Bakterium nur ein Phagenklon produziert wird.

In vorliegender Arbeit kam das pIII-Expressionssystem zum Einsatz, so dass sich im Folgenden allein auf die Darstellung desselben fokussiert wird.

1.3.2 pIII-Expressionssystem

Zur Verwirklichung von Smiths und McCaffertys Vision einzigartiger Phagenbibliotheken ist u.a. das pIII-Expressionssystem geeignet. Hierbei wird der Gensequenz des

Phagenproteins pIII die Sequenz des jeweils gewünschten Peptids angefügt, so dass letztlich ein Hybridprotein Peptid-pIII auf der Phagenoberfläche exprimiert wird.

Das Problem der Fusionierung an pIII besteht allerdings in einem möglichen Verlust der Infektiosität des Virus, da pIII, wie bereits dargelegt, die Infektion eines Prokaryoten initiiert (Barbas III et al. 2004). Eine Fusionierung führt somit zu einer ungenügenden Vervielfältigung der Phagen (Barbas III et al. 2004).

Ein weiterer Faktor, welcher Einfluss auf die Effektivität von Phagenbibliotheken nimmt, ist die gewünschte Anzahl der tatsächlich präsentierten Fusionsproteine auf der Oberfläche des Phagens, d.h. deren Valenz (Barbas III et al. 2004). Beide Faktoren werden daher durch den Einsatz verschiedener Expressionstypen versucht, positiv zu beeinflussen (Smith und Petrenko 1997).

Der Expressionstyp Typ 3 beschreibt hierbei das Vorhandensein eines einzigen Phagengenoms, in das ein Fusionsprotein kloniert wurde. Bei Herstellung des Phagens vom Typ 3 werden demgemäß im Idealfall alle fünf pIII-Positionen des Phagens mit einem Fusionsprotein Peptid-pIII besetzt sein. Der Phage wäre pentavalent. Da jedoch kein Wildtyp-pIII mehr vorhanden wäre, wäre die Infektiosität des Phagens gefährdet (Tikunova und Morozova 2009). Insbesondere bei großen fusionierten Proteinen, wie beispielsweise eines scFv, wäre die reduzierte oder gar mangelnde Infektiosität bei alleiniger Expression des Protein-pIII-Hybrids ein häufig anzutreffendes Problem (Barbas III et al. 2004).

Zur Lösung dieser Problematik wurde der Expressionstyp Typ 33 etabliert. Bei diesem wird ein Wildtyp-pIII zusätzlich zum Fusionsprotein auf das Phagengenom kloniert. Hierbei wird allerdings die Valenz des Phagens eingeschränkt, da sowohl Wildtyp-pIII wie Hybridprotein auf der Oberfläche exprimiert werden (Tikunova und Morozova 2009). Eine dem Typ 33 vergleichbare Variante ist das Expressionssystem Typ 3 + 3. Der Unterschied zu Typ 33 besteht darin, dass nun zwei separate DNA-Stränge vorhanden sind (Smith und Petrenko 1997).

Der erste DNA-Strang ist dabei ein DNA-Plasmid, welches in einem Prokaryoten eingebracht wurde und sowohl einen Replikationsursprung (origin of replication, sog. Ori) eines Phagens als auch eines Prokaryoten besitzt. Auf diese Weise ist eine Vervielfältigung des Plasmids durch ein Bakterium aber auch durch einen Bakteriophagen möglich. Eine Besonderheit dieses als Phagemid betitelten DNA-Plasmids ist seine im Vergleich zu rekombinanten Phagen höhere genetische Stabilität (Qi et al. 2012). Zudem trägt es ausschließlich das Peptid-pIII-Fusionsprotein und keine weiteren Phagenproteine (Tikunova und Morozova 2009). Auch besitzt das Phagemid eine Antibiotika-Resistenz (im vorliegenden Fall Ampicillin), welches eine spätere

Selektion Phagemid tragender Prokaryoten ermöglicht (Geneservice o. J.). Somit ist das Phagemid ein idealer Vektor für Phagenbibliotheken wie die Tomlinson J (1.3.3).

Alle anderen Phagenproteine – ggf. inklusive eines Wildtyp-pIII –, die zur Herstellung funktionstüchtiger Phagen notwendig sind, sowie ein weiterer Phagen-Ori (Smith und Petrenko 1997) sind indessen auf einem zweiten DNA-Strang codiert: dem DNA-Genom eines sog. Helferphagens, welcher das Phagemid tragende Bakterium superinfiziert (siehe 1.3.5).

Diese Superinfektion ist allerdings nur möglich, wenn entweder jegliche Hintergrundexpression des Fusionsproteins verhindert wird (Gao et al. 2002) oder ein Großteil der N-terminalen Domäne des fusionierten pIII-Proteins deletiert ist (Smith und Petrenko 1997). Eine vollständige N-terminale Domäne des Hybridproteins würde ansonsten eine Superinfektion des Phagemid tragenden Bakteriums mit einem Helferphagen verhindern (Gao et al. 2002) (Smith und Petrenko 1997).

Praktisch relevant wird dies durch die Benutzung eines Helferphagens, welcher im Besitz einer vollständigen N-terminalen Domäne des pIII ist und damit nach dessen Infektion ein vollständiges pIII-Protein in das prokaryotische Zellinnere eingeschleust hat. Dieses verhindert eine weitere Superinfektion und führt das infizierte Bakterium dazu, nur einen einzigen Phagenklon zu produzieren (Barbas III et al. 2004).

Nach Infektion bzw. während der zytoplasmatischen Vervielfältigung des Helferphagens kommen schließlich sowohl die Fusionsproteine als auch die Wildtyp-pIII-Proteine zur zellulären Expression. Beide Proteine werden daraufhin als Zufallsmosaik auf den sich an der Oberfläche des Bakteriums assemblierenden neuen Phagen präsentiert (Smith und Petrenko 1997). Nach Freisetzung des Phagens von der bakteriellen Zelloberfläche sind damit neue Fusionsprotein tragende funktionstüchtige Phagen entstanden.

Da parallel zur Vervielfältigung der Phagenproteine auch die Amplifikation von sowohl Phagemid- als auch Helferphagen-DNA erfolgt, findet sich im Corpus eines jeden neuen Phagens zudem eine Kopie der DNA entweder des Phagemids oder des Helferphagens (Paschke 2006). Die Koppelung von Genotyp und Phänotyp ist somit hergestellt (Barbas III et al. 2004).

Dieser Prozess der Hilfe des Helferphagens zur „Rettung“ des auf dem Phagemid codierten Phagenfusionsproteins aus seiner Gefangenschaft im Prokaryoten mit Expression neuer intakter Phagen wird als *phage rescue* bezeichnet (Paschke 2006).

Je nach Art der Anwendung und Ziel des Phage Displays kann zudem die Beschaffenheit des Helferphagens variiert und damit entscheidend auf das Outcome der Affinitätsselektionen des Fusionsproteins Einfluss genommen werden (siehe 1.3.5).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Expressionstyp Typ 3 + 3 verwendet, wobei als Fusionsprotein ein scFv-pIII gewählt wurde. Hierfür kam die wissenschaftlich etablierte

und bei Erwerben für akademische Zwecke frei verfügbare scFv-Bibliothek Tomlinson J zum Einsatz (siehe 1.3.3).

1.3.3 Original-Bibliothek Tomlinson J

In vorliegender Dissertation wurde die Human Single Fold scFv Library J (Tomlinson J) verwendet. Diese Bibliothek wurde einst durch Greg Winter und sein Team am Medical Research Council (MRC) Laboratory of Molecular Biology und am MRC Centre for Protein Engineering in Cambridge, Großbritannien, erstellt (Geneservice o. J.). Sie wird im Verlauf dieser Arbeit als Original-Bibliothek oder als Tomlinson J bezeichnet.

Diese semisynthetische scFv-Bibliothek wird auch als *single pot*-Library beschrieben (Geneservice o. J.), da sie halbsynthetisch erzeugt wurde (University of Aberdeen 2020) und damit unbeeinflusst hinsichtlich ihres Bindepotentials ist, wodurch potentiell jedes Antigen gebunden werden kann (Ahmad et al. 2012).

Ihr lukrativer Vorteil besteht daher in der Vielfalt möglicher Bindungspartner wie z.B. Proteine, Glykolipide, aber auch toxische oder nicht immunogene Antigene (Ahmad et al. 2012).

Die Tomlinson J arbeitet mit einem Typ 3 + 3-Expressionssystem (siehe 1.3.2), wobei die Phagemid tragenden Prokaryoten, hier der E. coli-Stamm TG1, zusätzlich zum scFv-pIII-Fusionsprotein ein Ampicillin-Resistenzgen auf ihrem Phagemid tragen (siehe 2.4.1). Somit besteht die Möglichkeit der selektiven Propagation der Phagemid tragenden Prokaryoten in einem ampicillinhaltigen Medium (Geneservice o. J.).

Die scFv der Original-Bibliothek fußen auf Boden des häufigsten humanen Frameworks (Weisser und Hall 2009), welches den menschlichen Keimbahngenen der schweren Kette V3-23/DP-47 inklusive JH4b sowie der leichten Kette Subtyp κ O12/O2/DPK9 plus Jk1 entspricht (de Wildt et al. 2000). Diese Kombination zeigt sich als in vivo stark exprimiert (de Wildt et al. 2000) (de Wildt et al. 1999) und stellt zudem eines der stabilsten Frameworks des menschlichen Antikörperrepertoires dar (Dudgeon et al. 2012) (Hairul Bahara et al. 2016).

Ein Teil der hochvariablen Regionen, d.h. CDR2 und CDR3 sowohl der schweren als auch der leichten Kette, wurde zudem einer Diversifikation mittels NNK-Triplets an insgesamt 18 Stellen unterworfen (Geneservice o. J.). Das NNK-Prinzip beschreibt hierbei eine zufällig gewählte Basenabfolge von je drei Nukleotiden, wobei N für die Basen Adenin (A), Thymin (T), Guanin (G) und Cytosin (C) codiert, indessen K für G oder T steht (Barbas III et al. 2004).

Die so durchgeführte Diversifikation erlaubte daher die Generierung von 32 unterschiedlichen Codons inklusive eines Ambercodons UAG bzw. TAG (siehe 1.3.3.1). Dieses Ambercodon würde statistisch gesehen bedingt durch das verwendete NNK-

Prinzip innerhalb der Tomlinson J mit einer Wahrscheinlichkeit von 43,59 % in mindestens einem ihrer Klone auftauchen (Marcus, Lindsay, et al. 2006). Nichtsdestotrotz wurde bereits in mehreren Artikeln ein Bias der Bibliothek hinsichtlich der bevorzugten Selektion von Ambercodon tragenden Phagen mit einem Anteil zwischen 50 – 100 % an allen selektionierten Phagen beschrieben (Pokorny et al. 2008) (Eteshola 2010) (Wu et al. 2007) (Boulter-Bitzer et al. 2009) (Fitting 2012) (ten Haaf 2015). Weitere Ausführungen zu diesem Phänomen finden sich unter 3.6 sowie 4.3.2. Insgesamt verzeichnet die verwendete Bibliothek Tomlinson J gemäß Herstellerangaben eine Größe von $1,37 \times 10^8$ verschiedenen scFv-pIII-Proteinen, wobei der prozentuale Anteil erfolgreich Insert tragender Klone mit 88 % angegeben wird (Geneservice o. J.).

1.3.3.1 Nonsense-Codons und Suppressorstämme

Das zelluläre Signal zur Beendigung der Translation eines Proteins stellen die Basentriplets UAG, UAA und UGA dar (Rassow 2012). Diese drei Triplets werden auch als Stop- oder Nonsense-Codons zusammengefasst (Mahy 2009).

Manche Bakterienstämme, u.a. auch der Phagemid tragende E. coli-Stamm TG1 der Tomlinson J, sind durch eine Mutation ihres Proteinbiosyntheseapparates dazu befähigt, Nonsense-Codons zu überlesen und dafür eine weitere Aminosäure in die wachsende Peptidkette einzubauen (Knippers 2006). Sie sind somit in der Lage, ein Nonsense-Codon, welches im Falle der TG1 durch künstliche Diversifikationsmutation erzeugt wurde, zu revertieren und letztlich in ein Protein zu übersetzen (Herrington 2018).

Da sie so die erste Mutation (das eingefügte Nonsense-Codon) durch eine zweite Mutation (jene in ihrem Syntheseapparat) supprimieren, werden sie auch als Suppressorstämme bezeichnet (Herrington 2018).

Non-Suppressorstämme besitzen dagegen keine revertierende Mutation, weshalb bei ihnen das Vorkommen eines Nonsense-Codons zu einem Abbruch der Translation führt (Geneservice o. J.).

Der hier verwendete E. coli-Stamm der Tomlinson-Bibliothek TG1 - genauso wie der Stamm XL1-Blue, welcher auch im Verlauf dieser Arbeit Verwendung findet - trägt eine revertierende Mutation (gln V (SupE)) im Gen einer seiner Transfer-RNAs (tRNA) (Knippers 2006). tRNA sind dabei RNA-Konstrukte, welche für den Einbau der korrekten Aminosäure während der Translation verantwortlich sind (Rassow 2012).

Die mutierte tRNA der erwähnten E. coli-Stämme ist befähigt, das Nonsense-Codon UAG (bzw. bei DNA TAG) in die Aminosäure Glutamin zu übersetzen und diese in die wachsende Peptidkette einzubauen (Knippers 2006) (Fitting 2012) (ten Haaf 2015). Der

eigentlich durch UAG indizierte Translationsstopp wird damit zu Gunsten des Glutamins (Q) überlesen.

Nach einem der Erstbeschreiber dieses Suppressionsphänomens, dem Doktoranden Harris Bernstein (Herrington 2018), wurde das Nonsense-Codon UAG auf den Namen *amber*, dem englischen Wort für Bernstein, getauft (Knippers 2006). In Analogie zu diesem Farbton wurden die verbliebenen zwei Nonsense-Codons vergleichbar farbenprächtig betitelt: *opal* für das Triplett UGA und *ochre* für das Codon UAA (Mahy 2009).

Insbesondere das Ambercodon hat besondere Relevanz für die vorliegende Dissertation, da es zur eukaryotischen Expression selektionierter ambercodonhaltiger scFv in das für Q codierende Codon CAG umgewandelt werden musste (siehe 2.8.5).

1.3.4 Prinzip des Phage Displays

Die Affinitätsselektion des Phage Displays fußt auf dem Prinzip des *survival of the fittest*. Dieser Begriff, welcher abgeleitet von Charles Darwins „*On the Origin of Species*“ (Darwin 1869), durch Herbert Spencer (Spencer 1864) geprägt wurde, beschreibt das Weiterkommen der Gene des wie auch immer gearteten Besten in nachfolgende Generationen. Hiermit geht die Elimination all jener anderen seiner eigenen Generation einher, die gleichfalls einzigartig waren, aber für die Umwelt, in der sie sich befanden, nicht die besten Ressourcen bzw. Anpassungen besaßen (Spencer 1864).

Ein Wechselspiel zwischen gegebener Umwelt und eigenen Ressourcen bestimmt letztlich den natürlichen Selektionsprozess des Lebens (Darwin 1869) (Spencer 1864). Dieser Prozess findet auch im Phage Display Verwirklichung.

Der Ausgangspunkt des Phage Displays ist hierbei eine Phagenbibliothek, z.B. die Tomlinson J. Diese ist in Analogie zu Darwin und Spencer der Ursprung aller selektionierbaren Phagen (**Original**-Bibliothek). Die Umwelt für den Selektionsprozess wird im Phage Display allerdings künstlich durch die gewählte PD-Strategie des Experimentators und dem hierdurch festgelegten Antigen bestimmt.

Dieses Antigen wird daraufhin die Umwelt der Phagen in der Original-Bibliothek maßgeblich beherrschen, so dass letztlich nur derjenige Phage weiterkommen wird, der die beste Anpassung (Bindung) an seine Umwelt zeigt (Smith und Petrenko 1997).

Da der Phage prinzipiell durch seine Hüllproteine in Kontakt mit seiner äußeren Umwelt tritt, welche durch Genotyp-Phänotyp-Koppelung somit gleich seiner inneren Welt ist, muss der „fitteste“ Phage folglich das beste Hüllprotein (im Fall der Tomlinson J das beste scFv-pIII-Fusionsprotein) auf seiner Oberfläche präsentieren und letztlich das jeweilige Antigen möglichst stark binden. Die Stärke bzw. Spezifität der Bindung an das

Antigen bestimmt daher den Grad der Anpassung an seine Umwelt bzw. im darwinschen Terminus den Grad seiner Fitness.

Alle Binder (d.h. bindende Phagen am Antigen) kommen daraufhin in die nächste Generation bzw. im Terminus des Phage Displays in die nächste Selektionsrunde und haben so Gelegenheit, ihr Genom zu tradieren und zu amplifizieren.

1.3.5 Prozedere des Phage Displays

Das Prozedere des Phage Displays (PD) ist als zyklisches System von Selektionsrunden, syn. Panning-Runden, angelegt. Mit jeder Selektionsrunde werden dabei über Anpassung der Bedingungen *in vitro* Phagen mit stärkerer Bindung (i.S.e. stärkeren Affinität) an das gewählte Antigen selektioniert. Daher wird dieses zyklische System in seiner Gesamtheit auch als Affinitätsselektion bezeichnet (Barbas III et al. 2004).

Das englische Wort *panning* (übersetzt Goldwäsche) bezieht sich hierbei auf die Methodik von ehemaligen Goldsuchern, Gold anzureichern, indem sie dieses durch multiple Waschungen von Schlamm befreien (Frenzel et al. 2016). In Analogie versucht man im PD, die affinsten Phagen aus der Fülle an unspezifischen Phagen herauszuwaschen. Dies gelingt u.a. durch die Affinität des auf der Oberfläche des Phagens präsentierte scFv-pIII-Fusionsproteins am Antigen, welches das „Wegwaschen“ verhindert.

Der erste Schritt einer jeden Panning-Runde besteht hierbei zunächst aus der Anzucht von Phagemid tragenden Bakterien. In der ersten Selektionsrunde werden hierzu jene der Original-Bibliothek verwendet (1.3.3). In den nachfolgenden 2. und 3. Selektionsrunden werden dann die jeweils aus der vorherigen Runde gewonnenen Output-Phagemid tragenden Bakterien angezüchtet.

Daraufhin erfolgt mithilfe eines Helferphagens die Reaktivierung der in den Bakterien auf dem Phagemid befindlichen scFv-pIII-Fusionsproteine sowie der Zusammenbau scFv-pIII-haltiger Phagen. Diese Produktion (2.7.1.2) mit nachfolgender Fällung der Phagen (2.7.1.3) ermöglicht die Durchführung der Selektion auf das gewählte Zielantigen, wie in vorliegender Arbeit auf ganze Zellen (2.7.1.4).

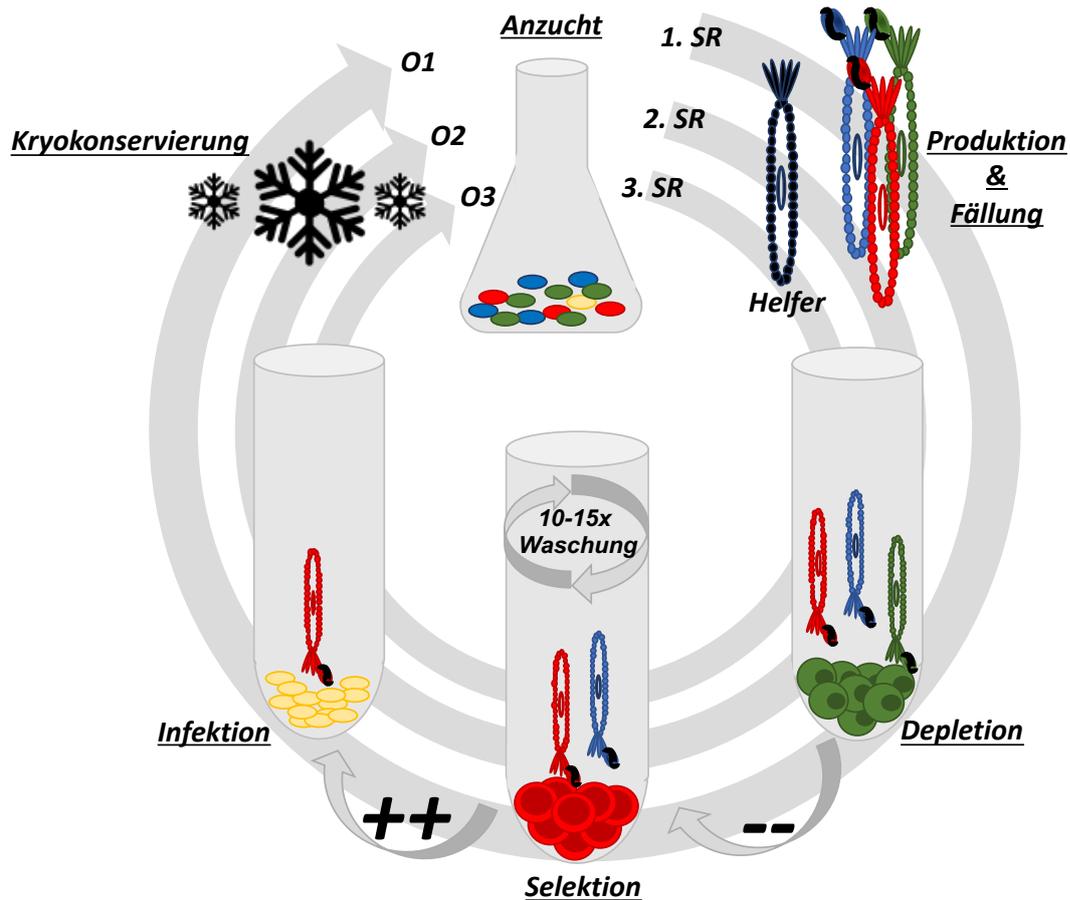


Abbildung 5: Schema der Phage Display (PD)-Selektionsrunden

Schematisch dargestellt ist das Prozedere der Selektionsrunden (SR) während des PD. Alle SR sind dabei gleich aufgebaut und starten jeweils mit der Anzucht von Phagemid tragenden Bakterien. In der 1. SR wird zur Anzucht die Original-Bibliothek verwendet, indessen für alle weiteren Runden die jeweils nach Durchlaufen des jeweiligen Rundenzyklus erhaltenen Output-Phagemid tragenden Bakterien Verwendung finden (O1 - 3). Nach der Anzucht erfolgt die Produktion der Phagen durch Infektion der Phagemid tragenden Bakterien mit einem Helferphagen (schwarz dargestellt). Dieser liefert alle benötigten, dem Phagemid fehlenden Proteine zum Zusammenbau eines Phagens. Die dann produzierten Phagen tragen durch den Phage Rescue des Helferphagens das scFv-pIII-Fusionsprotein auf ihrer Oberfläche, so dass sie nach ihrer Fällung, d.h. Gewinnung und Anreicherung, für die Depletion eingesetzt werden. Die Depletion beschreibt das Abfangen unspezifischer Binder durch Adhärenz an gesunde Spenderzellen (grün dargestellt). Die nachfolgende Selektion erfolgt mit den nicht gebundenen Phagen (Symbol: "--"), welche zu den Patientenzellen (rot) gegeben werden, um eine Bindung auf ihnen zu ermöglichen. Die auf den Primärzellen gebunden Phagen werden dann einer Waschung unterzogen, so dass nur jene Binder überstehen, die affin genug sind, um an den Zellen trotz der Waschungen gebunden zu bleiben. Diese Waschungen werden 10 bis 15 Mal wiederholt. Die dann noch an den Zellen gebundenen Phagen (Symbol: "++"), werden für die nun folgende Infektion verwendet, um frische Bakterien (gelb) mit den Phagemid beherbergenden Phagen zu infizieren, die so das Phagemid weitertradiieren. Diese Phagemid tragenden Bakterien werden final kryokonserviert, um für die darauffolgenden SR als Phagemid produzierende Input-Bakterien zur Verfügung zu stehen. Insgesamt werden 3 SR dieser Art durchgeführt.

Besonderen Wert wird im Rahmen dieser Dissertation auf nachfolgende drei Elemente des Selektionsprozesses gelegt:

1. Depletion auf gesunden Blutzellen,
2. Selektion auf Patientenzellen,
3. Waschung der gebundenen Phagen.

Jeder dieser Schritte leistet einen entscheidenden Beitrag zur Affinitätsselektion der besten Binder und demgemäß zum Output an Phagen nach jeder Selektionsrunde (SR). Daher werden diese Elemente in eigenen Unterkapiteln abgehandelt (siehe 1.3.5.1 bis 1.3.5.3).

Die nach Durchlaufen dieser drei Elemente erhaltenen Output-Phagen werden nachfolgend mithilfe von Bakterien kryokonserviert. Dies wird ermöglicht, indem die Output-Phagen nicht Phagemid tragende Prokaryoten infizieren, wodurch deren Phagemids in die Bakterienzelle eingeschleust werden (siehe 1.3.2).

1.3.5.1 Depletion

Ziel des PD der vorliegenden Arbeit ist die Generierung neuer möglichst AML-spezifischer Binder. Ein Alleinstellungsmerkmal dieser Binder wäre somit Positivität auf den AML-Selektionszellen bei Negativität auf gesunden Blutzellen.

Zum Erreichen dieses Zieles ist die Depletion ein entscheidender Schritt, welcher sich an die Herstellung und Fällung der Phagen anschließt. Zur Depletion werden Zellen verwendet, die den jeweiligen Selektionszellen möglichst ähnlich sind (Tikunova und Morozova 2009), im vorliegenden Fall gesunde Blutspenderzellen.

Je nach Art der Bearbeitung der Spenderzellen, z.B. via Dichtegradientenzentrifugation, Erythrozytenlyse oder Anreicherung von spezifischen Populationen wie Monozyten (siehe 2.6.1, 2.6.8, 2.6.9), lässt sich die Art und Vielfalt der Depletionsantigene (DA) steuern. DA stellen in diesem Kontext Antigene dar, die sowohl auf den Depletionszellen (gesunde Blutzellen) als auch auf den Selektionszellen (Blasten) vorhanden sind und somit nicht spezifisch für die Selektionszellen wären (Alfaleh et al. 2017). Der Sinn der Depletion ist es, die DA in ihrer Varianz so zu wählen, dass alle nicht selektionszellenspezifischen Binder abgefangen werden und nur diejenigen Binder zur Selektion durchgelassen werden, die ausschließlich auf den Selektionszellen binden (Tikunova und Morozova 2009).

In vorliegender Arbeit wurde daher die Anzahl der DA je PD-Strategie als zu kontrollierender Faktor erkannt und beeinflusst.

1.3.5.2 Selektion

Die sich nach der Depletion anschließende Selektion hat das Ziel, die vordepletierten Phagen weiter zu kondensieren, um letztlich den spezifischsten, d.h. „fittesten“ Binder zu erhalten (Smith und Petrenko 1997). Dies wird durch das in 1.3.5 beschriebene System aus zyklischen Selektionsrunden mit Zwischenamplifikationen der bis dato selektionierten Binder erreicht, so dass der Kreis der affinsten Binder sich immer weiter einschränkt.

Zudem lässt sich die Gesamtbindungsstärke, d.h. die Avidität der Phagen, beeinflussen, indem man die Valenz an auf ihrer Oberfläche exprimierten scFv-pIII-Fusionsproteinen steuert, wofür ein Helferphage benötigt wird. Für vorliegende Arbeit wurden die Helferphagen M13K07 sowie ein davon abgeleiteter Helferphage, auch Hyperphage M13K07 Δ pIII genannt, verwendet.

In der ersten Runde des PD sind durch die Anzucht der Bakterien der Original-Bibliothek nur ca. 100 Klone pro einzigartigem scFv-pIII-Phagemid vorhanden. Dies bedeutet, dass es durch diese geringe Anzahl an Phagen pro Klon alleine aufgrund zu harter Depletions- bzw. Selektionsstrategien dazu kommen kann, dass spezifische Klone nicht die nächste Generation erreichen (Smith und Petrenko 1997). In der ersten Selektionsrunde sollte daher auf eine möglichst hohe Anzahl an Bindern Wert gelegt werden, die die nächste Amplifikation erreichen.

Dies kann durch Expression der scFv-pIII-Hybridproteine auf allen fünf nativen pIII-Positionen erfolgen, wodurch die Avidität, d.h. die Gesamtbindungsstärke, erhöht und damit das Weiterkommen in die nächste Generation wahrscheinlicher gemacht werden kann. Das ist jedoch nur möglich, wenn kein natives pIII vorhanden ist, da dies präferentiell eingebaut werden würde (Paschke 2006). Aus diesem Grunde wurde der Hyperphage M13K07 Δ pIII etabliert.

M13K07 Δ pIII besitzt auf seinem Phagengenom kein natives pIII und kann nur mithilfe einer eigens zur Produktion dieses Phagens hergestellten pIII-exprimierenden E. coli-Zelllinie produziert werden (Rondot et al. 2001). Bei Infektion eines Phagemid tragenden Prokaryoten mit diesem Hyperphagen ist das Phagemid somit die einzige Quelle des pIII-Proteins, so dass dieses gekoppelt mit seinem fusionierten scFv mit höchster Valenz präsentiert werden kann (Paschke 2006).

Hierbei wird die Bedeutung der ersten Runde offenbar, da allein sie bestimmt, welcher der diversen, aber nur gering produzierten Binder der Original-Bibliothek weiterkommt (Smith und Petrenko 1997). Ab der zweiten Runde findet allerdings eine erneute Amplifikation statt, wodurch alle bis dato selektierten Phagen mit Häufigkeiten von mehreren Millionen Phagen pro einzigartigem Klon (Smith und Petrenko 1997) vorhanden sind und somit ab der 2. SR bessere Chancen aufweisen, die nächste Generation zu erreichen.

Ab dieser zweiten Selektionsrunde kann daher die Valenz zu Gunsten der Affinität aufgegeben werden, um möglichst spezifische Binder erhalten zu können. Die Affinität beschreibt somit die Stärke einer einzelnen Bindung eines scFv-pIII am Antigen und damit die Fitness des jeweiligen scFv-pIII-Hybridproteins. Eine monovalente Expression ist hierfür am besten geeignet (Smith und Petrenko 1997), welche durch die Benutzung

des Helferphagens M13K07 ab der zweiten Selektionsrunde ermöglicht werden kann (Vieira und Messing 1987) (Paschke 2006) (siehe Abbildung 6).

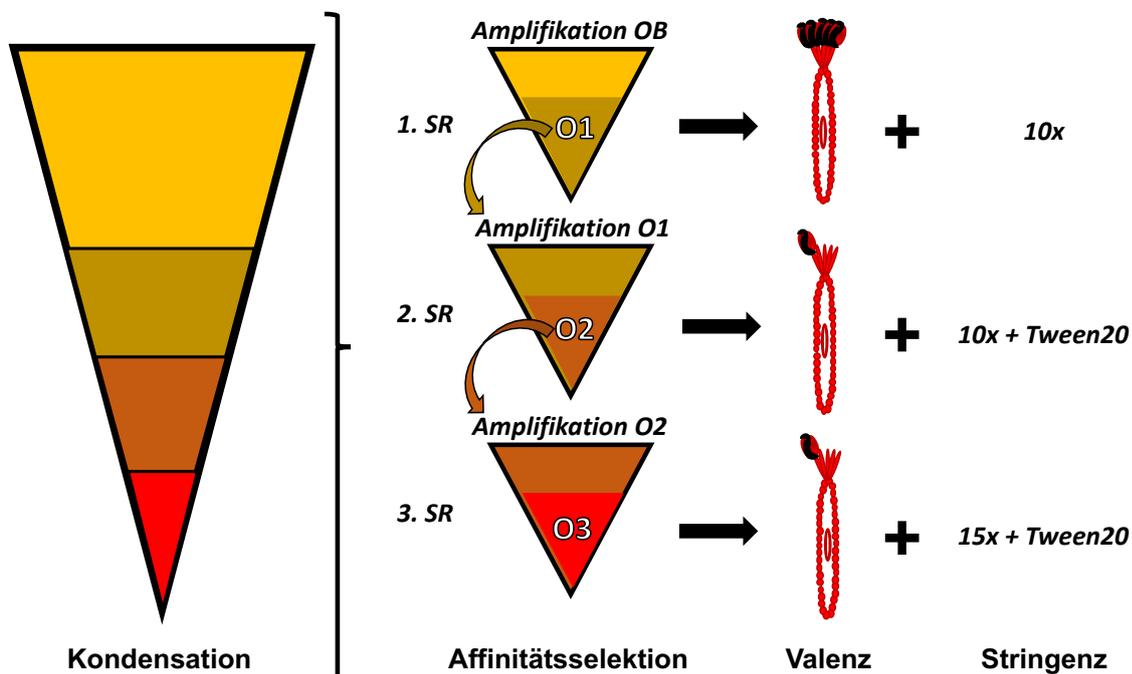


Abbildung 6: Einflüsse auf den Selektionsprozess des PD

Dargestellt sind die Möglichkeiten der Beeinflussung des Outcomes eines PD-Prozederes. Links zu sehen ist das Ziel des PD: Die Kondensation der anfangs verwendeten Original-Bibliothek (OB) auf einen spezifischen Phagen. Dies wird erreicht durch die drei rechts davon schematisch dargestellten Selektionsrunden (1. SR bis 3. SR). Innerhalb einer jeden Runde wird stets ein Teil der ursprünglich vorhandenen Phagen als unspezifisch bzgl. des gewünschten Antigens erkannt und exkludiert, so dass lediglich die Output-Phagen (O1 - 3) je Runde übrigbleiben. Diese Output-Phagen stellen nach deren Vervielfältigung (= Amplifikation) die Input-Phagen der jeweils nächsten Selektionsrunde (SR) dar, bis letztlich nach drei Runden die Affinitätsselektion abgeschlossen und eine Kondensation erzielt werden konnte. - Steuerbar wird diese Kondensation zum einen durch die Valenz des Helferphagens und zum anderen durch die Stringenz der Waschungen je Selektionsrunde. In der ersten Runde, in der ein Weiterkommen möglichst vieler Phagen zum Erhalt der Diversität gewünscht ist, wird daher der Helferphage M13K07 Δ pIII gewählt, der einen pentavalenten Fusionsprotein tragenden Phagen generiert und damit die höchste Avidität des Phagens produziert. Die Waschungen werden indessen gering gehalten (10-fach = 10x). - In den nachfolgenden Runden wird der Schwerpunkt der Selektion dann auf Affinität verlagert, so dass eine monovalente Expression des Fusionsproteins gewünscht ist, welche durch den Helferphagen M13K07 ermöglicht wird. Gleichfalls wird die Waschstringenz durch Hinzunahme des Detergens Tween[®]20 (Tween20) sowie durch erhöhte Zahl an Waschungen verschärft (bis zu 15-fach = 15x) (siehe Tabelle 8). - Somit sind Valenz und Stringenz die Stellgrößen der Einflussnahme auf die Affinitätsselektion in vorliegender Arbeit.

Dieser Helferphage besitzt ein funktionstüchtiges Wildtyp-pIII, das somit bevorzugt in neugebildete Phagen eingebaut wird, so dass maximal 10 % der durch seinen *phage rescue* produzierten Phagen ein einziges scFv-pIII-Fusionsprotein auf der Oberfläche exprimieren (Griffiths und Duncan 1998). Bivalente Expressionen gibt es sehr viel seltener (Tikunova und Morozova 2009). Durch diese Monovalenz kann die PD-Strategie auf eine reine Affinitätsselektion ausgerichtet werden, so dass in vorliegender Arbeit das

Schema aus Hyperphagen- (1. SR) und Helferphageninfektion (2. / 3. SR) gewählt wurde.

Sowohl Helfer- als auch Hyperphage besitzen überdies im Genom codiert eine Kanamycin-Resistenz (Zourob et al. 2008), so dass eine erfolgreiche Infektion des Prokaryoten durch eine neu aufgetretene Kanamycin-Resistenz nachgewiesen werden kann.

1.3.5.3 *Waschung*

Auch die Waschstringenz, d.h. die Härte des Waschens der gebundenen Phagen als Teil des Selektionsprozesses, folgte der Logik der Auswahl der verwendeten Helferphagen. So sollten nach der ersten Selektionsrunde möglichst viele Binder die Folgerunde erreichen, welches durch eine verminderte Anzahl an Waschschritten im Vergleich zu den Folgerunden begünstigt wurde (Weisser und Hall 2009).

Durch Erhöhung der Anzahl der Waschschriffe und Hinzunahme des Detergens Tween[®]20 in den folgenden Selektionsrunden wurde nachfolgend die Stringenz der Waschungen gesteigert, um ausschließlich die affinsten Binder zu selektionieren (vgl. (Fitting 2012) (ten Haaf 2015)) (siehe Abbildung 6).

1.4 **Ziel der Dissertation**

Ziel der vorliegenden Dissertation war es, mithilfe des Phage Displays Antikörperfragmente zu generieren, welche möglichst spezifisch Antigene auf der Zelloberfläche von AML-Blasten erkennen, um deren leukämietypische Oberflächenstrukturen näher zu charakterisieren.

Hierzu sollte zunächst die Methodik des PD für ganze, unversehrte Zellen optimiert werden. Potential zur Optimierung wurde gemäß Literaturrecherche (siehe 2.1) insbesondere in der bislang wenig ausgenutzten Depletion sowie der Aufreinigung der AML-Zellen für den Erhalt hochreiner Blastenpopulationen zur Selektion gesehen, so dass entsprechende Optimierungsstrategien entwickelt, durchgeführt und auf ihre Effektivität untereinander verglichen werden sollten.

Eine parallele Evaluation mehrerer PD-Strategien auf intakten AML-Patientenzellen unter Variation von Depletionsantigenen ist nach aktuellem Kenntnisstand in der Literatur unbeschrieben.

Nach erfolgter Optimierung des PD sollten die erhaltenen Antikörperfragmente hinsichtlich ihres Bindeverhaltens sowie Kreuzreaktivitäten weiter charakterisiert werden, um den potentiellen Nutzen von derart gewonnenen AK abschätzen zu können. Ein extrazellulärer, AK-basierter Ansatz zur Komplementierung intrazellulärer Therapeutika wie dem Tyrosinkinase-Inhibitor Midostaurin (S. Kayser und Levis 2018)

dient der Komplettierung der AML-Therapie. Dies gilt insbesondere aufgrund der Heterogenität der Erkrankung AML und ihrem breiten Mutationsspektrum mit voraussichtlich unerreichbarem Ziel eines *one-size-fits-all treatments* (Einheitsbehandlung) (Talati und Sweet 2018). Eine Kombinationstherapie aus mehreren zielgerichteten Therapeutika scheint daher für die zukünftige AML-Therapie erstrebenswert (S. Kayser und Levis 2018). Der Fokus dieser Arbeit auf Zelloberflächen bindende Antikörper trägt diesem Gedanken Rechnung.

Material und Methoden

2.1 Literaturrecherche

Zu Beginn dieser Arbeit wurde eine Literaturrecherche durchgeführt. Hierbei wurde unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> folgende Suchanfrage gestellt:

```
((("bacteriophages" [MeSH Terms] OR "bacteriophages" [All Fields] OR "phage" [All Fields] AND display[All Fields]) AND ("leukemia, myeloid, acute" [MeSH Terms] OR ("leukemia" [All Fields] AND "myeloid" [All Fields] AND "acute" [All Fields]) OR "acute myeloid leukemia" [All Fields] OR ("acute" [All Fields] AND "myeloid" [All Fields] AND "leukemia" [All Fields])))
```

Die Suchanfrage bezog alle in PubMed bis November 2016 gelisteten Artikel mit ein. Es wurden 21 Artikel vorgeschlagen. Hiervon waren ein Artikel nicht einsehbar (Arza et al. 2000), 13 Artikel ohne Nutzwert für die Aufgabenstellung der hier vorliegenden Doktorarbeit ((Cohen-Saidon et al. 2003) (Piloto et al. 2005) (Stevenson 2006) (Stein et al. 2010) (Reunanen et al. 2010) (Crépin et al. 2010) (K. Li et al. 2014) (Strassberger et al. 2014) (Suojanen et al. 2014) (Collin et al. 2015) (Le Gall et al. 2015) (Moradi-Kalbolandi et al. 2016) (Feng et al. 2016)) und sieben Artikel von ähnlichem Ansatz wie diese Dissertation ((Bakker et al. 2004) (Geuijen et al. 2005) (Jäger et al. 2007) (Galili et al. 2008) (Karjalainen et al. 2011) (Mohseni Nodehi et al. 2012) (Fitting et al. 2015)).

Jene 13 Artikel, welche nicht eingehende Erörterung in dieser Arbeit finden, wurden exkludiert, da sie entweder nicht das Kriterium der Selektion auf ganzen, intakten Zellen erfüllten oder ohne leukämische Zellen bzw. Primärzellen requiriert worden waren.

Sieben Artikel verblieben mit vergleichbarer Zielsetzung wie vorliegende Dissertation, so dass jene in ihrer Relevanz für vorliegende Arbeit unter 3.1 nähere Erörterung finden.

2.2 Materialaufstellung

Zur leichteren Lesbarkeit der Arbeit sind die detaillierten, tabellarischen Materialaufstellungen im Anhang unter 6.2 für weitere Einsichtnahmen gelistet.

2.3 Primer

2.3.1 Sequenzierungsprimer

Die in Tabelle 4 gelisteten Basenabfolgen der Sequenzierungsprimer sind aus ten Haaf (ten Haaf 2015) entnommen und über MWG Eurofins als Oligonukleotide bezogen worden.

Primer	Sequenz 5' → 3'
pMS2-5'	CCA AGC TGG CTA GCC ACC ATG
pMS2-3'	GTA CTC ACC CCA ACA GCT GG
Mouse-Fc-pMS2-3'	GAT GAA GAC GGA TGG TCC AC
pIT2-5'	CAG GAA ACA GCT ATG AC
pIT2-3'	CTA TGC GGC CCC ATT CA

Tabelle 4: Sequenzierungsprimer

2.3.2 Mutageneseprimer

Nachfolgende Primer (siehe Tabelle 5) zur ortsspezifischen Mutagenese (2.8.5) wurden individuell je nach Insert-Sequenz mithilfe der Software LasergeneCoreSuite entworfen. Durch den spezifischen Austausch einer Base wurde je Sequenz ein CAG-Triplett eingefügt. Der in der Sequenz jeweils klein geschriebene Buchstabe zeigt den durchgeführten Basenaustausch an.

Primer	Sequenz 5' → 3'	Angewendet für Insert Nr.
AML_WT_11_T	GAG TGG GTC TCA AGT ATT cAG CAT TTG GGT TCG CGG	11
AML_WT_11_B	CCG CGA ACC CAA ATG CTg AAT ACT TGA GAC CCA CTC	
AML_WT_14_T	GAG TGG GTC TCA ACG ATT cAG GGG CGT GGT CAT AGG	14, 22, 44
AML_WT_14_B	CCT ATG ACC ACG CCC CTg AAT CGT TGA GAC CCA CTC	
AML_WT_24_T	GGA GTG GGT CTC AAC TAT TAC TcA GCG GGG TAG TAG	24, 35
AML_WT_24_B	CTA CTA CCC CGC TgA GTA ATA GTT GAG ACC CAC TCC	
AML_WT_33_T	GAT TCA GAA TCG TGG TcA GAG TAC AGC GTA CGC AGA	33
AML_WT_33_B	TCT GCG TAC GCT GTA CTC TgA CCA CGA TTC TGA ATC	

Tabelle 5: Mutageneseprimer

2.4 Vektoren

In vorliegender Dissertation kamen zwei Vektoren zum Einsatz. Der pIT2-Vektor stellte dabei den Ursprungsvektor der verwendeten scFv-Phagen-Bibliothek Tomlinson J des Medical Research Council Centre for Protein Engineering in Cambridge dar.

Der pMS2-Vektor wurde gemäß den Angaben unter ten Haaf (ten Haaf 2015) hergestellt und verwendet.

2.4.1 pIT2-Vektor

Der pIT2-Vektor der Tomlinson J enthielt die gemäß dem NNK-Prinzip diversifizierte scFv (siehe 1.3.3). Die aus ihm resultierenden Proteine waren sowohl mit einem His-Tag als auch mit einem Myc-Tag zur Aufreinigung am späteren C-terminalen Ende des Proteins versehen (siehe Abbildung 7). Zur Expression des scFv auf der Phagenoberfläche fand eine Koppelung mit dem Phagenprotein pIII statt. Hierbei war eine TAG-Sequenz (Ambercodon) zwischen die Basenpaare der jeweiligen proteincodierenden Sequenzen geschaltet, um die Produktion löslicher scFv in einem Non-Suppressorstamm (siehe 1.3.3.1) bei Bedarf ggf. ohne weitere Mutationen durchführen zu können (Geneservice o. J.).

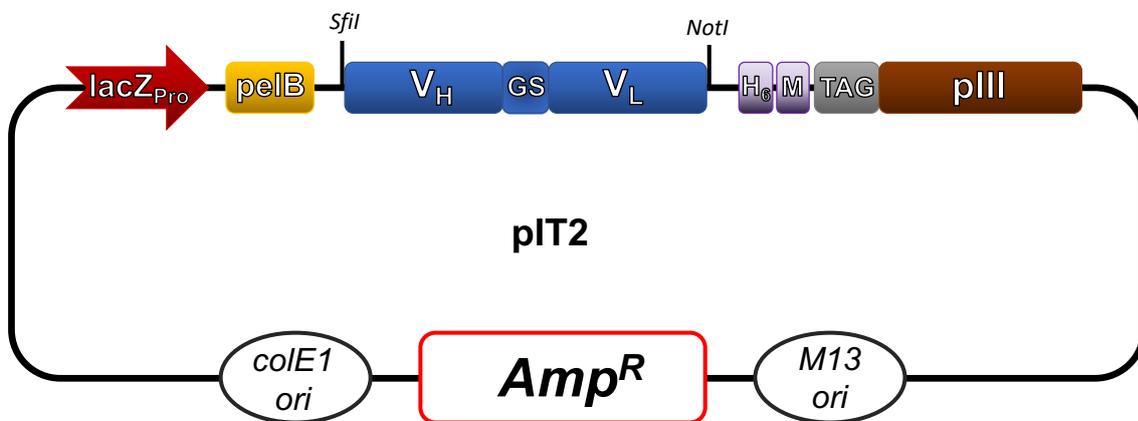


Abbildung 7: pIT2-Vektor

Schematisch abgebildet sind die im Verlauf der Arbeit wichtigsten Expressionskassetten, Resistenzgene und Oris des pIT2-Vektors, in welchen die Original-Bibliothek kloniert war (gemäß (ten Haaf 2015)). Der lacZ-Promotor (*lacZ_{Pro}*) steuert die Expression des scFv, welches flankiert wird durch die beiden Restriktionsenzymchnittstellen *SfiI* und *NotI*. Anschließend sind für spätere Aufreinigungen diverse Tags zu finden (*His₆*-(*H₆*)- und *Myc*-(*M*)-Tag), welche gefolgt von einem Ambercodon (*TAG*) zum Minor-Phagenhüllprotein *pIII* überleiten, das das Hybridfusionsprotein vervollständigt. Die *pelB*-Sequenz (*pelB*) dient der Sekretion des transkribierten und translatierten Produktes in das Periplasma des Prokaryoten. Für die Replikation besitzt das Plasmid einen Phagen-Ori (*M13 ori*) sowie einen prokaryotischen Ori (*colE1 ori*). Es liegt somit ein Phagemid vor. Eine Selektion der Phagemid tragenden Bakterien wird durch ein Ampicillin-Resistenzgen (*Amp^R*) ermöglicht.

Zur Assemblierung der Phagen wurde zudem eine *PelB*-Leader-Sequenz hinzugefügt, welche die fertig translatierten Proteine zur Plasmamembran und letztlich ins Periplasma

des Bakteriums führte. Die Translation wurde hierbei durch die ribosomale Bindungsstelle (RBS) eingeleitet, indessen die vorherige Transkription durch einen lacZ-Promotor ermöglicht wurde. Dieser lacZ-Promotor konnte im Verlauf durch den synthetischen Induktor dieses Promotors Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) angeschaltet werden (ten Haaf 2015).

Zur alleinigen Selektion Plasmid tragender Prokaryonten war auf dem Plasmid zudem eine Ampicillin-Resistenz integriert, welche durch zwei Replikationsursprünge (Ori) flankiert wurde. Einer dieser Ori war hierbei ein prokaryotischer Ori, um die Vermehrung des Plasmids im Bakterium zu ermöglichen. Der zweite Ori war der des Phagens M13, welcher nach Infektion des Bakteriums mit einem filamentösen Phagen die Produktion des Fusionsproteins scFv-pIII erlaubte (siehe 1.3.5).

2.4.2 pMS2-Vektor

Der pMS2-Vektor wurde verwendet, um das fertig selektionierte scFv mit einem Fc-Teil eines Maus-Antikörpers (Subtyp IgG2a) zu koppeln (siehe 2.8.9). Hierdurch wäre bei Studien in vivo die Möglichkeit der Rekrutierung weiterer Effektorzellen durch das Fc-Fragment gegeben (siehe 1.2). Durch Einbringen des Fc-Teils des Maus-AK, d.h. C_H2 und C_H3, konnte eine bivalente Expression des scFv ermöglicht werden (ten Haaf 2015).

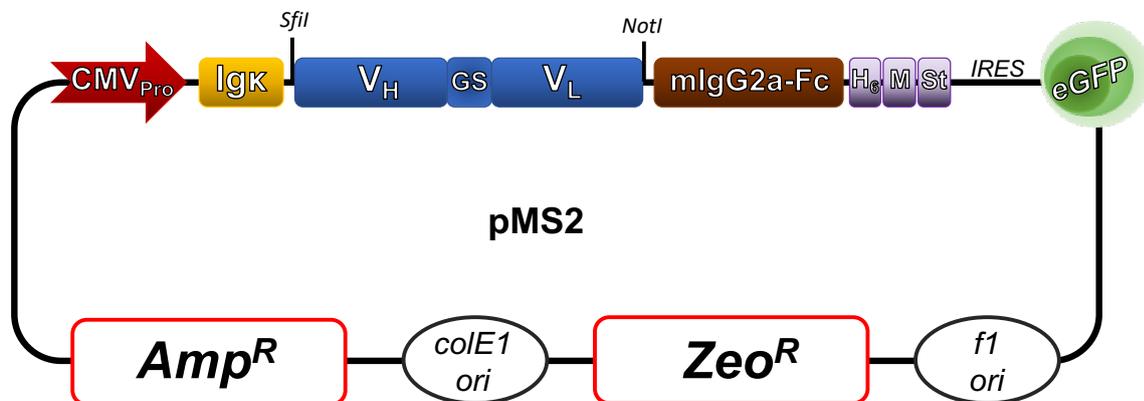


Abbildung 8: pMS2-Vektor

Abgebildet ist der pMS2-Vektor, der zur eukaryotischen Expression des scFv-Fc in HEK293T-Zellen Verwendung fand. Auch hier ist das scFv von zwei Restriktionsenzymstellen (*SfiI* und *NotI*) flankiert. Das scFv wird hierbei gefolgt von einem murinen Fc-Fragment des Immunglobulins G, Subklasse 2a (*mIgG2a-Fc*). Beide Anteile stehen unter einem starken Cytomegalievirus-Promotor (*CMVPro*). – Die Sekretion des Proteins in den Überstand des Kulturmediums der HEK293T wird durch eine Leader-Sequenz der leichten Kette der Subklasse κ gesteuert (*Igk*). Für potentielle Aufreinigungen waren sowohl ein His₆ (*H₆*)- als auch ein Myc- (*M*)- und ein StrepII- (*St*)-Tag eingefügt worden, welche nach dem *mIgG2a-Fc* zu finden direkt in eine IRES-Sequenz überleiten. Diese interne ribosomale Eintrittsstelle (*IRES*) dient der verstärkten Expression des nachfolgenden grünen Fluoreszenzproteins *eGFP*. Neben den Replikationsursprüngen für Phage (*f1 ori*) und Prokaryot (*colE1 ori*) besitzt der pMS2-Vektor zudem zwei Resistenzgene gegen die Antibiosen Zeocin (*ZeoR*) und Ampicillin (*AmpR*). Auch der pMS2-Vektor ist somit ein Phagemid.

Im pMS2-Vektor waren zudem diverse Tags eingefügt (Myc-Tag, His₆-Tag und StrepII-Tag), welche eine spätere Aufreinigung und Detektion ermöglichten. Um mit diesem Vektor stabil transfizierte Eukaryoten (HEK293T-Zellen, human embryonic kidney cells) zu detektieren, wurde ihm eine eGFP-Sequenz (enhanced green fluorescence protein) hinzugefügt. Die Expression des eGFPs wurde durch die IRES-Sequenz (interne ribosomale Eintrittsstelle) verstärkt. Durch sie konnte die Bindung an zytoplasmatische Ribosomen und somit die Translation stattfinden (Fitting 2012).

Die Sekretion der so hergestellten scFv-Fc in den HEK-Überstand erfolgte durch eine Leader-Sequenz der leichten Immunglobulinkette des Typs κ (siehe 1.2.1). Insgesamt stand die Transkription unter dem Einfluss eines CMV-Promotors, wodurch eine hohe Expression erzielt werden sollte (ten Haaf 2015).

Zusätzlich zu der bereits im pT2-Vektor enthaltenen Ampicillin-Resistenz besaß der pMS2-Vektor auch eine Zeocin-Resistenz, welche zwischen zwei Oris geschaltet war. Hierbei handelte es sich um den Phagen-Ori f1 sowie den prokaryotischen Ori colE1 (siehe 1.3.2).

2.5 Humane Spenderzellen

2.5.1 AML-Patienten

Gemäß dem Aktenzeichen 140 / 16 der Gießener Ethikkommission wurden Primärzellen nach schriftlichem Einverständnis von Patienten der Medizinischen Klinik IV, Hämatologie, Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen, bezogen.

2.5.2 Gesunde Blutspender

Als Kontrolle wurde Blut von freiwilligen, gesunden Spendern eingesetzt. Alle Spender haben dafür ihr schriftliches Einverständnis vor der jeweiligen Blutentnahme erteilt. AB-Serum wurde gemäß des Gießener Ethikvotums AZ 05 / 00 bezogen.

2.6 Zelluläre und zellbiologische Methoden

2.6.1 Dichtegradientenzentrifugation

Die Dichtegradientenzentrifugation mithilfe des Polymers Ficoll-Hypaque ist eine Technik zur Isolierung von u.a. humanen Blutzellen. Sie zählt zu den isopyknischen Zentrifugationen, da die Zellpopulationen anhand unterschiedlicher Dichten voneinander getrennt werden (Luttmann et al. 2014).

Neutrophile Granulozyten sind dabei schwerer als das Polymer, weshalb sie innerhalb der erythrozytären Sedimentationsmasse zu finden sind. Monozyten, Lymphozyten und

Thrombozyten sind indessen von geringerer Dichte, weshalb sie nach Zentrifugation oberhalb der Ficoll-Phase zu liegen kommen. Während Thrombozyten sich im Plasmaüberstand wiederfinden, werden mononukleäre Zellen, d.h. Monozyten, Lymphozyten und - wenn vorhanden - Blasten, als eine Art Schleier erkennbar und können so separiert entnommen werden (Luttmann et al. 2014).

Peripheres Blut bzw. eine Zellsuspension wurde zur Auftrennung der Populationen im Verhältnis 1 : 1 mit RPMI-Medium (Roswell Park Memorial Institute-Medium) gemischt. Daraufhin wurde Ficoll-Hypaque in ein Zentrifugenröhrchen vorgelegt und anschließend im Verhältnis 1 : 3 mit dem RPMI-Zell-Gemisch langsam überschichtet.

Anschließend wurde mit maximal 800 g für 30 Min. bei ausgeschalteter Bremse zentrifugiert, um ein erneutes Vermischen der getrennten Fraktionen zu verhindern. Falls die Zellen direkt für einen Versuch benötigt wurden, wurde die Zentrifugationsdauer auf 15 Min. beschränkt.

Der nachfolgend sichtbare Schleier aus PBMC (peripheral blood mononuclear cells) wurde zur Reinigung vom zytotoxischen Ficoll-Hypaque noch weitere zwei Mal mit RPMI-Medium gewaschen. Hierfür wurde bei 800 g für 10 Min. bzw. 5 Min. abzentrifugiert. Anschließend erfolgte die Resuspension in RPMI-Medium + 10 % FBS (fetal bovine serum) + 1 % P/S (Penicillin / Streptomycin) zur Zellzählung ggf. mit nachfolgender Kryokonservierung (siehe 2.6.3).

2.6.2 Zellzahlermittlung

Zellzahlen wurden mithilfe einer Neubauerzählkammer ermittelt. Diese bestand aus vier Großquadraten, die wiederum aus je 16 Kleinquadraten zusammengesetzt waren (Luttmann et al. 2014).

Die Zellen wurden vor der Zählung mit Trypanblau angefärbt, um die Zellviabilität zu beurteilen. Dieser blaue Farbstoff gelangt nur bei beschädigten Zellen ins Zellinnere und färbt daher allein nekrotische respektive apoptotische Zellen an (Louis und Siegel 2011). Alle vitalen, d.h. nicht blauen Zellen wurden pro Großquadrat einzeln ausgezählt und der Mittelwert aus allen vier Großquadraten berechnet. Dieser wurde daraufhin unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors durch die Trypanblaufärbung mit dem Volumen der Zählkammer multipliziert, um letztlich die Zellzahl pro Milliliter zu erhalten (Luttmann et al. 2014) (siehe Formel 1).

$$\frac{\text{Zellzahl in 4 Großquadraten}}{4} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 = \text{Zellzahl /ml}$$

Formel 1: Zellzahlberechnung einer Neubauerzählkammer

2.6.3 Kryokonservierung

Nach durchgeführter Dichtegradientenzentrifugation (siehe 2.6.1) wurden native Blutzellen in Kryoröhrchen zu 25×10^6 , 15×10^6 , 10×10^6 oder 5×10^6 Zellen kryokonserviert. Gleichfalls wurden die verwendeten Zelllinien nach Expansion eingefroren, um bei Bedarf auf eine frühe Charge zurückgreifen zu können.

Für beides wurden die Zellen bei 1.500 rpm für 5 Min. abzentrifugiert und das Pellet in je 1 ml Einfriermedium aufgenommen. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C .

Zur Charakterisierung von Patientenmaterial respektive gesunden Blutzellen wurde bei Bedarf eine FACS-Färbung angeschlossen (siehe 2.6.4).

Bei erneutem Einsatz der kryokonservierten Zellen wurden sie am Tag vor dem jeweiligen Experiment aufgetaut, bei 1.500 rpm für 5 Min. in RPMI-Medium gewaschen, mit neuem Medium in eine Kulturflasche überführt und nachfolgend über Nacht bei 37 °C gelagert.

Sofern es sich um Zelllinien handelte, wurden sie gleichfalls aufgetaut und gewaschen sowie nachfolgend wie unter 6.2.12 beschrieben weiterkultiviert.

2.6.4 Konventionelle Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie, auch *fluorescence-activated cell sorting / scanning* (FACS) genannt, ist ein Verfahren, welches in wässriger Strömung befindliche Zellen einzeln mittels Laser erfasst. Bei Durchtritt einer Zelle durch den Laserstrahl wird Licht abgelenkt. Diese messbare Streuung wird in eine Vorwärtsstreuung (d.h. FSC, forward scatter) und eine in 90° -Winkel dazu abgehende Seitwärtsstreuung (d.h. SSC, side scatter) unterteilt. Der FSC ist hierbei ein Maß für die reelle Größe der Zelle, indessen der SSC Rückschlüsse auf die Granularität der Zelle zulässt (Luttmann et al. 2014).

Durch Auftragen dieser beiden Größen gegeneinander entsteht ein Diagramm, kurz Plot genannt. Mit diesem lassen sich bereits drei Populationen des Blutes voneinander abgrenzen: Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten (siehe Abbildung 9).

Für weitere Subtypisierungen dieser Populationen sind Antikörper notwendig, welche Zellmembran gebundene Antigene hochspezifisch erkennen und gleichzeitig mit einem Fluorochrom gekoppelt sind. Dieses Fluorochrom emittiert nach Anregung durch den Laser des Durchflusszytometers seinerseits ein charakteristisches Lichtspektrum, welches über sogenannte Photomultiplier Tubes (PMTs) detektiert werden kann. Durch die Verwendung mehrerer Anregungslaser unterschiedlicher Wellenlängen und den Einsatz verschiedener Antikörper gekoppelter Fluorochrome mit unterschiedlichen Anregungs- und Emissionsspektren lassen sich so an einer Zelle parallel mehrere Messungen der Oberflächeneigenschaften durchführen (Luttmann et al. 2014).

Zur Färbung der Zellen, d.h. zu ihrer Beladung mit Fluorochrom gekoppelten Antikörpern, sind je nach Antigen, verwendeten Zellen und Art der benutzten Antikörper bzw. Phagen verschiedene Protokolle etabliert worden, welche im Verlauf der vorliegenden Arbeit detailliert beschrieben werden.

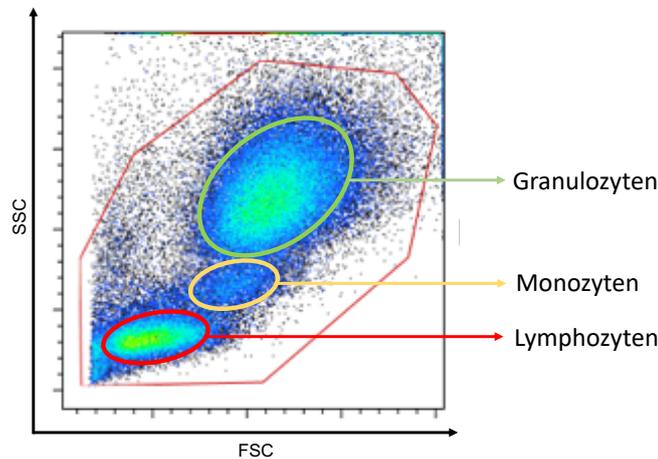


Abbildung 9: FSC-SSC-Plot

Abgebildet ist das Beispiel eines FSC-SSC-Plots, entnommen aus der Gatingstrategie für gesunde Blutspenderzellen (siehe 2.12.2). Auf der Ordinate ist der SSC aufgetragen, welcher die Granularität der Zellen beschreibt. Auf der Abszisse ist der FSC zu finden, welcher die Größe der Zellen angibt. Beide Größen sind in linearem Maßstab (lin) aufgetragen. – Bei Messungen von Fluoreszenzwerten wird die abgebildete lineare Darstellung konventioneller Weise logarithmisch (log) skaliert.

Anhand dieses Plots können die Zellpopulationen der Lymphozyten (roter Kreis), Monozyten (gelber Kreis) und Granulozyten (grüner Kreis) bereits dargestellt werden. Alle Zellen sind zudem in einem gemeinsamen großen Vieleck (dunkelorange) als lebende Zellen für weitere Auswertungszwecke gekennzeichnet, d.h. gated, worden.

2.6.4.1 Kontrollen

Zur Detektion der emittierten Spektren einzelner Fluorochrome ist innerhalb eines Durchflusszytometers jedem Fluorochrom ein Detektor 1 : 1 zugeordnet. Daher limitiert die Anzahl der PMT die Anzahl der parallel benutzbaren Fluorochrome je Experiment (Baumgarth und Roederer 2000).

Die Emission eines Fluorochroms ist zudem nicht auf eine definierte Wellenlänge beschränkt, sondern entspricht einem Emissionsspektrum, welches sich über einen für das jeweilige Fluorochrom charakteristischen Wellenlängenbereich ausdehnt (siehe Abbildung 10). Somit ist es möglich, dass verschiedene Fluorochrome Überlappungen in ihrem emittierten Spektrum zeigen und in den Detektor des jeweils anderen Fluorochroms „hineinstrahlen“. Dies führt wiederum zu falsch-positiven Ergebnissen durch das jeweils andere Fluorochrom (Baumgarth und Roederer 2000).

Um diesen Bias möglichst minimal zu halten, ist das Mitführen von spezifischen Kontrollen je FACS-Experiment essentiell. Durch sie wird eine sog. Kompensation ermöglicht, d.h. ein Abschätzen des falsch-positiven Signalanteils am Gesamtmesswert

durch Berücksichtigung des Überlappungsbereichs der Emissionsspektren (Luttmann et al. 2014).

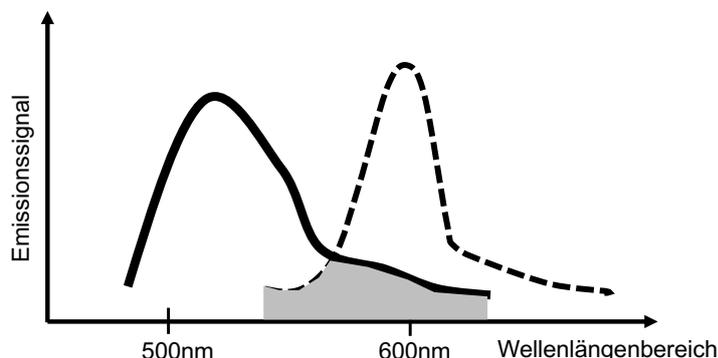


Abbildung 10: Überlappungsbereich von Fluorochromen

Zu sehen ist der Überlappungsbereich von Emissionsspektren zweier fiktiver Fluorochrome. Im grau hinterlegten Wellenlängenbereich überlagern sich die Spektren, welches eine Entscheidung, ob die Emission von dem einen oder dem anderen Fluorochrom stammt, unmöglich werden lässt. Ziel der Kompensation ist es, diesen Überlappungsbereich zu entlarven und damit die falsch-positive Ereignisrate eines Detektionssignals möglichst niedrig zu halten.

Nachfolgend sind daher die Kontrollen aller FACS-Experimente der konventionellen Durchflusszytometrie als Übersicht tabellarisch zusammengefasst. Weitere Ausführungen finden sich, falls erforderlich, bei den jeweiligen Experimenten.

FACS-Experiment	Färbung	Kontrolle
Bestimmung des prozentualen Anteils an Blasten (2.6.6)	CD34Fitc	Isotyp Fitc
Adhärenzanreicherung von Monozyten (2.6.9)	CD14PE	Isotyp PE
Immunmagentische Separation (2.6.7)	CD34Fitc	Isotyp Fitc
Phagenexperimente (2.7.2, 2.7.3, 2.7.4)	Phage(n) + [anti-M13 + gamFitc]	[anti-M13 + gamFitc]
Transfektion von HEK293T (2.8.10)	Plasmid-Reporter-GFP	Nicht transfizierte Zellen
Analyse der scFv-Fc im konventionellen Durchflusszytometer (2.10)	[scFv-Fc + gamFitc]	Nicht transfizierter Überstand (NT) + gamFitc

Tabelle 6: Konventionelle Durchflusszytometrie – Kontrollen

Anmerkung: Die eckigen Klammern beschreiben das Tandem aus einem nicht fluoreszierenden AK mit seinem fluoreszierenden Ortungs-AK.

2.6.4.2 Histogramme - Gatingstrategie

Um im konventionellen FACS Histogrammdarstellungen (Häufigkeitsverteilungen) zu analysieren, wurden zunächst alle lebenden Zellen anhand des bereits erwähnten FSC-SSC-Plots (siehe 2.6.4) gekennzeichnet (d.h. gated) und damit Zelltrümmer, welche durch ihre geringere Größe und Granularität von lebenden Zellen unterschieden werden können, von der Auswertung exkludiert.

Mithilfe der mitgeführten Kontrollen wurde daraufhin ein positives Gate (Abbildung 11) gesetzt. Dieses Gate wurde dabei so gelegt, dass maximal 2,5 % des jeweiligen rechtsseitigen Histogrammausläufers der Kontrolle in ihm zu liegen kamen.

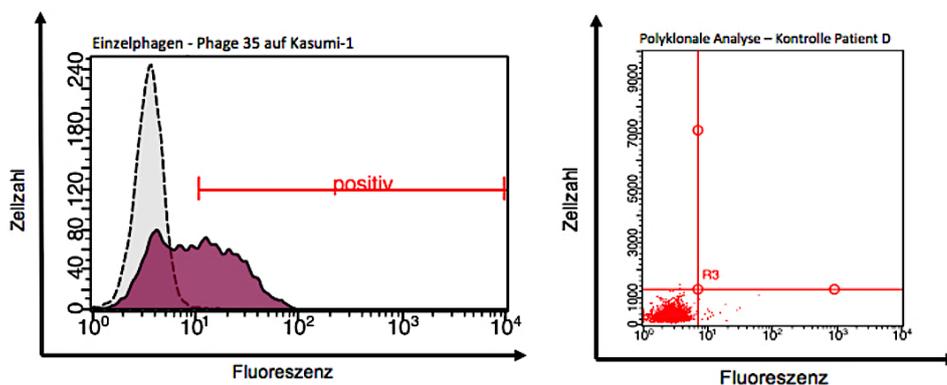


Abbildung 11: Gatingstrategie der Kontrollen

Dargestellt sind zum direkten Vergleich sowohl die Gatingstrategie der Histogramme (links) als auch diejenigen der Dot Plots (rechts). - Beispielhaft für das Histogramm-Gating wurde eine Einzelphagenfärbung (siehe 6.6.1) auf Kasumi-1 dargestellt (links). Im Hintergrund ist in Hellgrau die Kontrolle abgebildet, welche mit ihrem Ausläufer im als „positiv“ deklarierten Gate (rote Horizontale) nicht mehr als 2,5 % der Gesamtpopulation zu liegen kommt. Der positive Messwert der gefärbten Kasumi-1-Zellen ist demgegenüber in Aubergine dargestellt im Vordergrund zu sehen. In Histogrammdarstellungen sind folglich In-Frame-Überlagerungen (d.h. Darstellung von mehreren Messungen in einem Diagramm) möglich.

Der rechts dargestellte Dot Plot ist entnommen aus der polyklonalen Analyse (siehe 3.5.2) des Patienten D. Das positive Gate entspricht hier dem Quadranten rechts der rot dargestellten Zellpopulation jenseits der roten Vertikalen. Auch hier durften maximal 2,5 % der Kontrollzellen zu liegen kommen. In-Frame-Darstellungen sind in Dot Plots unter der hier verwendeten Auswertungssoftware (siehe 6.2.10) nicht möglich.

Beide Diagrammdarstellungen verfolgen das Ziel, positive Populationen abzugrenzen. Sie entsprechen somit zwei verschiedenen Weisen, prozentuale Anteile darzustellen. Für alle FACS-Experimente im konventionellen Durchflusszytometer wurde nachfolgender, einheitlicher Farbcode verwendet und über alle Experimente hinweg beibehalten: Aubergine: Kasumi-1, Rot: primäre Patientenzellen, Grün: Gesunde Blutspenderzellen, Weiß: HEK293T, Hellgrau: Phagen-Experiment-Kontrolle, Hellgelb: scFv-Experiment-Kontrolle.

2.6.4.3 Dot Plots - Gatingstrategie

Die Gatingstrategie für Dot Plots (Punktdiagramme) unterschied sich in ihrer Aussagekraft nicht von derjenigen der Histogramme. Auch hier wurden die Zellausreißer so gewählt, dass maximal 2,5 % der Zellen der Kontrolle im positiven Bereich zu finden waren. Die Darstellung einer jeden Zelle als Punkt anstelle einer Häufigkeitsverteilung definierte den Unterschied.

2.6.4.4 *Hinweis*

Sofern Abwandlungen der Strategien vorgenommen wurden, sind diese jeweils bei der Beschreibung des entsprechenden Experimentes erörtert.

Die *median fluorescence intensity*, im Folgenden MFI genannt, diente bei allen FACS-Experimenten als Auswertungsgrundlage. Sie beschreibt den Median aller Fluoreszenzsignale einer Messung. Als Median ist diese Auswertungsbasis am statistisch robustesten gegen etwaige Ausreißer (Cleff 2008), weshalb sich zu ihrer Verwendung entschieden wurde.

2.6.5 **Spektrale Durchflusszytometrie**

Wie bereits angeklungen, ist eines der zentralen Probleme des konventionellen Durchflusszytometers die Überlappung der Emissionsspektren der verschiedenen Fluorochrome. Die dadurch notwendige Kompensation gestaltet sich häufig komplex und ist wenig sensitiv für niedrige Signalwerte. Über- und Unterkompensationen sind daher zentrale Probleme einer jeden Auswertung konventioneller FACS-Daten (Roederer 2001).

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit ist daher ein Wechsel von der konventionellen zur spektralen Durchflusszytometrie angestrebt worden, welche eine höhere Trennschärfe der Signale ermöglichte (Futamura et al. 2015) (Giesecke und Kaiser 2017).

Auch die spektrale Durchflusszytometrie arbeitet mit Fluorochromen und PMTs. Im Unterschied zur konventionellen Methode ist jedoch nicht jedem Emissionsspektrum ein PMT zugeordnet. Vielmehr werden alle Spektren gleichzeitig und im gesamten Ausdehnungsbereich ihrer Wellenlängen durch ein lineares PMT-System mit vorgelagertem Prisma erfasst (Giesecke und Kaiser 2017). Dies ermöglicht eine feinere Auflösung und Diskrimination von Signalintensitäten auch in Überlappungsarealen (Nolan und Condello 2013).

Die Kalibrierung des Gerätes erfolgte mit UltraComp eBeads von Thermo Fisher Scientific, welche zuvor mit denjenigen Antikörpern gemäß Herstellerangaben versehen wurden, die im jeweiligen Experiment Verwendung fanden. Die dabei aufgenommenen Referenzspektren dienten als Matrix der späteren Auswertungen und wurden mit freundlicher Unterstützung des Teams der AG Immunologie (Leitung: Prof. Dr. Gregor Bein) erstellt.

2.6.5.1 *Kontrollen*

Nach Kalibrierung des spektralen Durchflusszytometers und Erstellung der Referenzspektrenmatrix wurden zur Validierung der korrekten Durchführung des jeweiligen Experimentes experimentelle Kontrollen benötigt. Als für diese

experimentellen Kontrollen geeignet erwies sich nach Literaturrecherche das Prinzip der *fluorescence minus one* (FMO) (Giesecke und Kaiser 2017) (Tung et al. 2004).

Hierbei wird je Versuch eine experimentelle Kontrolle mitgeführt, die alle zu messenden Fluorochrome bis auf dasjenige Fluorochrom enthält, welches das Antigen von Interesse färben soll.

Nach durchgeführtem Experiment wird diese FMO-Kontrolle mit dem Messwert des interessierenden Targets verrechnet. Somit wird sichergestellt, dass mögliche Interaktionen der restlichen Fluorochrome bzw. Antikörper keinerlei Einfluss auf den Messwert haben.

Auch zelluläre Autofluoreszenzen, welche je Zellpopulation sehr variabel sein und ähnlich falsch-positive Messwerte wie ein Fluorochrom verursachen können, fallen so nicht länger ins Gewicht. Mit diesem Prinzip lässt sich daher höchste Präzision für den interessierenden Messwert erreichen (Giesecke und Kaiser 2017).

Da für die Experimente in vorliegender Arbeit jeweils ein mit Fluoresceinisothiocyanat (Fitc) gekoppelter Antikörper zur Detektion des interessierenden Messwertes zum Einsatz kam, wurde die FMO-Kontrolle jeweils ohne diesen Fitc-Antikörper konstruiert (siehe Tabelle 7). Zur Kontrolle des Einflusses der Autofluoreszenz wurde jedem Experiment zudem eine ungefärbte Zellprobe hinzugefügt.

FACS-Experiment	Färbung	FMO-Kontrolle
Analyse der scFv-Fc in der spektralen Durchflusszytometrie (2.12)	Diverse AK inklusive [scFv-Fc + gamFitc]	Diverse AK <u>ohne</u> [scFv-Fc + gamFitc]

Tabelle 7: Spektrale Durchflusszytometrie – Kontrollen

Anmerkung: Die eckigen Klammern beschreiben das Tandem aus einem nicht fluoreszierenden AK mit seinem fluoreszierenden Ortungs-AK.

2.6.6 Bestimmung des prozentualen Anteils an Blasten

Der prozentuale Anteil der Blasten an allen Patientenzellen nach Dichtegradientenzentrifugation (2.6.1) sowie der Nachweis ihrer Expression des Oberflächenmoleküls CD34 (cluster of differentiation 34) waren für die Entscheidung insbesondere bzgl. einer immunmagnetischen Separation (2.6.7) von zentraler Bedeutung.

Daher wurde zum Abschätzen dieses Anteils eine konventionelle FACS-Färbung mit einem konjugierten, d.h. direkt mit einem Fluorochrom gekoppelten Antikörper gegen CD34 durchgeführt.

Hierfür wurden 250.000 Patientenzellen bei 2.600 rpm für 5 Min. in Waschpuffer-FACS (WP-FACS) gewaschen, in 100 µl WP-FACS resuspendiert und letztlich mit je 5 µl pro Antikörper versetzt. Die Inkubation erfolgte für 30 Min. bei 4 °C.

Nach Ablauf der Inkubation wurde eine erneute Waschung in 1 ml WP-FACS, eine Zentrifugation bei 2.600 rpm für 5 Min. und anschließend eine Messung in 300 µl Volumen angeschlossen.

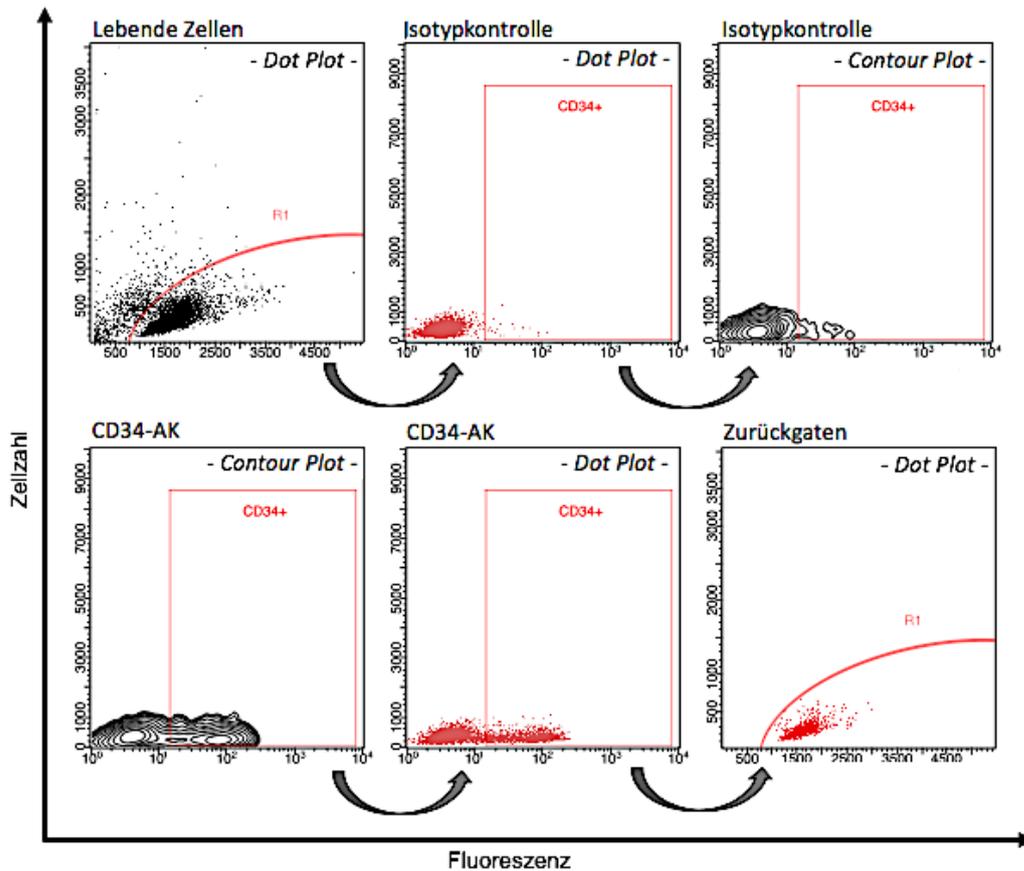


Abbildung 12: Gatingstrategie des prozentualen Anteils an Blasten

In der obersten Reihe ist zunächst das Gating ohne CD34-AK-Färbung dargestellt, um das spätere CD34-positive(+)-Gate der positiven Zellen zu definieren. Hierfür wird zunächst im Dot Plot auf den lebenden Teil der Gesamtpopulation gegatet (R1, roter Halbmond), welcher anschließend im Dot Plot für Fluoreszenz des zu färbenden AKs angeschaut wird. Da in der oberen Reihe ein unspezifischer an ein Fluorochrom gekoppelter AK (Isotypkontrolle) gefärbt wurde, können alle Zellen der obersten Reihe als negativ identifiziert werden. Diese Isotypkontrolle ist essentiell, um Hintergrundsignale zu erkennen und falsch-positive Messwerte zu minimieren. Das CD34+Gate ist definiert als alle potentiellen Messwerte rechts dieser negativen Population. Der ganz rechts gezeigte Contour Plot ist zum Setzen des positiven Gates hilfreich, da durch ihn die Dichteverteilung der gemessenen Zellen abgeschätzt werden kann.

Nach Färbung mit dem entsprechenden CD34-AK (unterste Reihe), werden - insbesondere anhand des Contour Plots definierbar - zwei distinkte Populationen unterscheidbar. Die im CD34+Gate gemessenen Zellen können durch erneutes Zurückgaten auf den Ursprungsplot der lebenden Zellen in der Gesamtpopulation geortet und damit weiterverfolgt werden.

2.6.6.1 Gatingstrategie

Zunächst wurde anhand des FSC-SSC-Plots auf alle lebenden Zellen gegatet und das CD34-positive Gate durch die Isotypkontrolle definiert (vgl. 2.6.4). Zusätzlich erfolgte

eine Darstellung als Contour Plot, da hierbei die Dichteverteilungen der Zellen abgeschätzt und das Setzen des positiven Gates vereinfacht werden konnte.

Durch Übertragung des derart erhaltenen positiven Gates auf eine CD34-Färbung konnte so der prozentuale Anteil von CD34-positiven (CD34+) Zellen an der Gesamtpopulation eruiert werden (siehe Abbildung 12). Diese CD34+ Population wurde daraufhin als Blasten definiert.

2.6.7 Immunmagnetische Separation

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurden im Rahmen der PD-Selektionen hochreine Blastenpopulationen angestrebt. Daher wurde, sofern genügend Patientenmaterial vorhanden war, eine magnetische Aufreinigung mittels CD34-MicroBeads durchgeführt (syn. magnetic-activated cell sorting, MACS).

Das Prinzip dieser Art der Aufreinigung beruht auf AK, welche mit magnetischen Beads konjugiert sind. Wenn diese AK an ihr jeweiliges Antigen auf einer Zelle mit entsprechendem Oberflächenmerkmal gebunden haben, können jene Zellen bei Wanderung durch eine in einem Magnetfeld befindliche Säule zurückgehalten werden (Luttmann et al. 2014). Nach mehrmaligem Waschen der Säule und nachfolgendem Entfernen aus dem Magnetfeld kann die so angereicherte Zellpopulation - in diesem Fall CD34+ Blasten - von der Säule eluiert werden (Luttmann et al. 2014).

Hierfür wurde das CD34-MicroBeads Kit von Miltenyi Biotec verwendet. Die Aufreinigungsschritte wurden gemäß Herstellerangaben durchgeführt.

Die Reinheit des Eluats und der Waschfraktion wurden im Anschluss mittels konventionellem Durchflusszytometer überprüft. Um ein falsch negatives Messergebnis zu vermeiden, wurde darauf geachtet, einen FACS-CD34-AK-Klon (Klon 581) zu verwenden, welcher divers zu demjenigen des CD34-MicroBeads-AK-Klon (Klon QBEND/10) war. Es wurde die Gatingstrategie wie unter 2.6.6.1 angegeben verwendet, wobei sich eine dezidierte Darstellung der FACS-Auswertungsstrategie der Immunseparationsreinheit im Anhang unter 6.3 findet.

2.6.8 Erythrozytenlyse

Gleichfalls wurde im Verlauf der Arbeit für die PD-Depletionen nach einer Möglichkeit gesucht, alle Leukozytenpopulationen aus peripherem Blut zu gewinnen. Es wurde sich letztlich für die Möglichkeit der Erythrozytenlyse entschieden.

Hierfür wurde BD Pharm Lyse™ von der Firma BD Biosciences verwendet. Dieses wurde als Verdünnung 1 : 10 in vollentsalztem Wasser (VE-Wasser) auf den pH 7,3 eingestellt und für jedes Experiment neu angesetzt.

Das zu lysierende Blut der freiwilligen Spender wurde pro Experiment in Ethylendiamintetraacetat-(EDTA-)Röhrchen am Tag des Experiments abgenommen.

Je 2,5 ml Spenderblut wurde mit 25 ml Lyse-reagenz gemischt und für 12 Min. auf einem Schüttler bei Raumtemperatur (RT) leicht geschwenkt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 5 Min. bei 1.200 rpm.

Das Pellet wurde daraufhin mit 25 ml PBS (phosphate-buffered saline) + 1 % hitzeinaktiviertem FBS resuspendiert und bei 1.200 rpm für 5 Min. zentrifugiert. Dieser Waschschritt wurde mit 20 ml PBS-FBS-Lösung erneut durchgeführt. Es schloss sich eine Zählung der Zellen an (2.6.2), um die erhaltenen gesunden Leukozyten mit ihrer Zellzahl an die pro Experiment eingesetzten Patientenblasten anzugleichen.

2.6.9 Adhärenzanreicherung von Monozyten

Ebenfalls im Rahmen der PD-Depletionen wurden Monozyten aus dem Blut gesunder Spender angereichert. Zunächst war hierfür eine Dichtegradientenzentrifugation (2.6.1) notwendig, um nachfolgend mit reinen PBMC weiterarbeiten zu können.

Diese wurden in RPMI + 10 % FBS aufgenommen und mit einer Dichte von $2 - 3 \times 10^6$ Zellen/ml in eine T175 cm² Zellkulturflasche für eine einstündige Inkubation bei 37 °C ausplattiert. Hierbei wurde ausgenutzt, dass Monozyten eine starke Adhärenz an Plastik zeigen (Schad 2008) (Delirezh et al. 2013).

So konnte nach der Inkubation der Überstand einfach entfernt und die am Plastikboden adhärennten Monozyten durch zweimaliges Waschen mit auf 37 °C vorgewärmtem PBS gereinigt werden. Nach Zugabe von neuem Medium (RPMI + 10 % FBS) wurden die Monozyten über Nacht bei 37 °C weiterkultiviert, ehe sie am nächsten Tag weiterverwendet werden konnten.

Zur Überprüfung des Anreicherungs-erfolges wurde zudem eine FACS-Färbung nach dem monozytären Antigen CD14 (Haziot et al. 1988) durchgeführt. Hierbei wurde die unter 2.6.6.1 beschriebene Gatingstrategie angewandt, wobei zur Definition des positiven Gates der Monozytenmarker CD14 (Haziot et al. 1988) Anwendung fand.

2.6.10 Herstellung von Cytospins

Die Herstellung von sog. Cytospins ist eine Methode zur Fixierung von Zellsuspensionen auf Objektträgern (Luttman et al. 2014). Die Fixation wird hierbei durch Zentrifugation in einer Cytozentrifuge nach Auftragen in sog. CytofunnelsTM erreicht. Diese CytofunnelsTM stellen eine Art Trichter dar, welcher auf einem zuvor eingelegten Objektträger mündet und nach Zentrifugation eine Beurteilung der Zellen auf dem Objektträger ermöglicht. Die Zellsuspensionen können hierfür bereits vor oder auch erst

nach der Zentrifugation, z.B. im Sinne von immunzytochemischen Färbungen, weiterverarbeitet werden (Luttmann et al. 2014).

In vorliegender Arbeit wurden die zu fixierenden Zellsuspensionen stets vor Zentrifugation bearbeitet und via AK immunzytochemisch gefärbt, so dass sich lediglich das Eindecken der Präparate anschloss (siehe 2.11).

Dieses Eindecken geschah mit Vectashield Mounting Medium versetzt mit DAPI (4'-Diamidino-2-phenylindol). Das hierbei enthaltene DAPI ist einen Fluoreszenzfarbstoff, der zur Markierung von DNA eingesetzt wird und unter UV-Anregung blaues Licht emittiert (Luttmann et al. 2014). Eine bläuliche Färbung des Zellkerns in der Konfokalmikroskopie wurde so ermöglicht (siehe 2.11).

2.7 Phage Display

2.7.1 Allgemeines Schema

Aufgrund der großen Relevanz des Phage Displays für die vorliegende Dissertation wird nachfolgend ein detailliertes allgemeines Schema beschrieben, auf welches im Verlauf der Arbeit mehrfach zurückgegriffen wird.

2.7.1.1 Tag 1, Bakterienanzucht

Zum Start einer jeden neuen Selektion musste ein bei – 80 °C gelagertes Aliquot der Original-Bibliothek Tomlinson J aufgetaut und in 200 ml 2xYT^{AMP/GLU} (100 µg/ml Ampicillin + 1 % Glukose gelöst in 2xYT-Medium) für 12 – 16 Stunden bei 37 °C in einem Inkubationsschüttler bei 250 rpm angezüchtet werden.

Für die jeweils nachfolgenden 2. und 3. Selektionsrunden sind wiederum die aus der vorherigen Selektionsrunde an Tag 5 aliquotierten TG1 aufzutauen gewesen, um in 50 ml 2xYT^{AMP/GLU} weiterkultiviert zu werden.

Zudem waren neue, noch kein Plasmid tragende kompetente TG1 auszuplattieren. Hierfür wurde M9-Minimal-Medium-Agar in Petrischalen verwendet. Diese mit TG1 ausplattierten Agarpetrischalen wurden bei 37 °C über Nacht bebrütet, nachfolgend in Parafilm eingewickelt und bei 4 °C bis zum Gebrauch gelagert.

2.7.1.2 Tag 2, Phagenproduktion

Zum Start der Phagenproduktion wurden je Selektionsrunde 12,5 ml 2xYT^{AMP/GLU} solange mit den über Nacht angezüchteten Bakterien versetzt, bis eine Optische Dichte (OD) von 0,08 – 0,09 erreicht wurde. Hierfür waren Volumina der Übernachtskultur zwischen 200 – 350 µl von Nöten.

Daraufhin wurde die Bakteriensuspension bei 37 °C und 250 rpm schüttelnd bebrütet, um eine OD zwischen 0,4 – 0,5 zu erreichen. Bei dieser OD wurde die bakterielle logarithmische Wachstumsphase mit größtmöglicher F-Pilus-Expression erwartet und daher als optimal zur Infektion mittels Hyper- bzw. Helferphagen angesehen.

Um das Wachstum in dieser logarithmischen Phase abzustoppen, wurden die Bakterien mittels Eisbad abgeschreckt und 5 ml der gewachsenen Kultur entweder mit 10 µl Hyperphagen M13K07ΔpIII (nur 1. Selektionsrunde, entsprechen ca. 10¹² Phagen/ml) oder 100 µl Helferphagen M13K07 (2. und 3. Selektionsrunde, entsprechen ca. 10¹¹ Phagen/ml) versetzt. Zur Infektion der Bakterien wurde zunächst für 30 Min. bei 37 °C ohne Schütteln, nachfolgend für 30 Min. bei 37 °C mit Schütteln bei 250 rpm inkubiert.

Daraufhin wurde die Suspension bei 4.500 g für 5 Min. bei 4 °C abzentrifugiert und in 2xYT^{AMP/KAN/IPTG} (100 µg/ml Ampicillin + 50 µg/ml Kanamycin + 0,25 mM IPTG in 2xYT-Medium) resuspendiert. Durch den Austausch von Glukose mit diesem 0,25 mM IPTG-haltigen Medium wurde das Ablesen des Phagemids durch Induktion des Lactose-Promotors (siehe 2.4.1) ermöglicht, wodurch die Phagenproduktion bei 30 °C für 18 – 20 Stunden unter ständigem Schütteln bei 250 rpm eingeleitet werden konnte.

Zur Kontrolle der Infektion wurde ein 2xYT-Agar^{AMP/KAN} (100 µg/ml Ampicillin + 50 µg/ml Kanamycin gelöst in 2xYT-Agar) mit 50 µl der zuvor frisch infizierten Bakterienkultur ausplattiert. Ein rasenartiger Bewuchs am nächsten Tag nach Inkubation der Platte bei 37 °C bestätigte die erfolgreiche Infektion mittels Hyper- bzw. Helferphagen (Kanamycin-Resistenz) sowie Phagemidpersistenz (Ampicillin-Resistenz) in den Bakterien.

2.7.1.3 Tag 3, Phagenfällung

Zur Gewinnung der produzierten Phagen wurden die Kulturen für 30 Min. bei 4 °C und 4.500 g abzentrifugiert. Zeitgleich wurde eine Polyethylenglykol-6.000-Natriumchlorid-(PEG-NaCl)-Lösung auf Eis vorgekühlt.

Der phagenhaltige Überstand wurde nachfolgend in ein neues Zentrifugenröhrchen transferiert und mit 5 ml PEG-NaCl-Lösung versetzt. Unter zeitweiligem Schütteln wurde die Phagenfällung i.S. einer PEG-NaCl-Phagen-Präzipitation für 60 Min. auf Eis abgewartet.

Letztlich wurde das Präzipitat bei 12.000 rpm für 30 Min. bei 4 °C abzentrifugiert und in 250 µl PBS aufgenommen. Anschließend wurde erneut für 2 Min. bei 13.000 g und 4 °C abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß (syn. Tube) überführt. Die Lagerung dieser Phagensuspension über Nacht erfolgte bei 4 °C.

Zur Messung des Phagen-Input-Titers wurden zudem 12,5 ml 2xYT mit kompetenten TG1 von der M9-Minimal-Agarplatte bis zum Erreichen einer OD von 0,08 – 0,09 inokuliert und nachfolgend bei 37 °C und 250 rpm bis zu einer OD von 0,4 – 0,5 inkubiert. Sollten die Bakterien nicht innerhalb von zwei Stunden eine OD von 0,4 – 0,5 erreicht haben, wurden sie verworfen und ein erneuter Ansatz durchgeführt. Dieses Zeitlimit besaß für alle Experimente mit Bakterienkulturen Gültigkeit.

Gleichfalls wurde bei jeder Anzucht kompetenter TG1 eine 50 µl Kontaminationskontrolle auf einen 2xYT-Agar^{AMP/KAN} (100 µg/ml Ampicillin + 50 µg/ml Kanamycin gelöst in 2xYT-Agar) ausplattiert. Ein leerer Bewuchs zeigte, dass die TG1 von keinem Phagen befallen waren und somit Verwendung finden konnten. Bei jeder dieser Kontaminationskontrollen wurde gleichfalls ein leerer 2xYT-Agar^{AMP/KAN} mitbebrütet, um auch eine Kontamination des Agars auszuschließen.

Für die Bestimmung des Input-Titers der Phagen musste im Anschluss eine Verdünnungsreihe erstellt werden. Da im Verlauf dieser Dissertation mehrere Verdünnungsreihen bei diversen Phagenexperimenten anzulegen waren, wird im Folgenden das Anlegen einer solchen Reihe exemplarisch für alle weiteren dargestellt. Zunächst wurden vier 1,5 ml fassende Reaktionsgefäße mit je 198 µl PBS befüllt. Die erste Verdünnung (d.h. 10⁻²) erhielt man durch Übertragen von 2 µl Phagensuspension in ein mit PBS vorgelegtes Reaktionsgefäß. Nach Vermengung erfolgte aus diesem Tube eine Überführung von 2 µl in das nächste 198 µl PBS-haltige Tube (Verdünnungsstufe 10⁻⁴). Dieser Vorgang wurde bis zur Verdünnungsstufe 10⁻⁸ wiederholt.

Anschließend wurden 800 µl TG1 der OD 0,4 – 0,5 hinzugefügt und diese für 30 Min. bei 37 °C ohne Schütteln und weitere 30 Min. bei 37 °C mit Schütteln bei 250 rpm inkubiert. Je 10 µl pro Verdünnungsstufe wurden daraufhin auf einen 2xYT-Agar^{AMP/GLU} (100 µg/ml Ampicillin + 1 % Glukose gelöst in 2xYT-Agar) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Am Folgetag wurden die gewachsenen Kolonien gezählt und der Input-Titer anhand folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Anzahl der Kolonien} \times 5}{0,01 \text{ ml} \times \text{Verdünnungsstufe}} = \text{CFU/ml}$$

Formel 2: Input- bzw. Output-Titer-Berechnung

Der Input-Titer, angegeben in *colony forming units* pro Milliliter (CFU/ml), beschreibt die Anzahl an Phagen, die zur Weiterverwendung zur Verfügung stehen. Hierbei beschreibt der Faktor 5 im Zähler die Verdünnung (200 µl Phagenlösung plus 800 µl TG1). Die

0,01 ml im Nenner stehen für das ausplattierte Volumen von 10 µl pro Agarplatte. Selbige Formel ist auch für die Berechnung des Output-Titers (2.7.1.5) gültig.

2.7.1.4 Tag 4, Panning

In vorliegender Arbeit wurden insgesamt fünf verschiedene PD-Strategien auf ganzen AML-Zellen angewandt (siehe Abbildung 13).

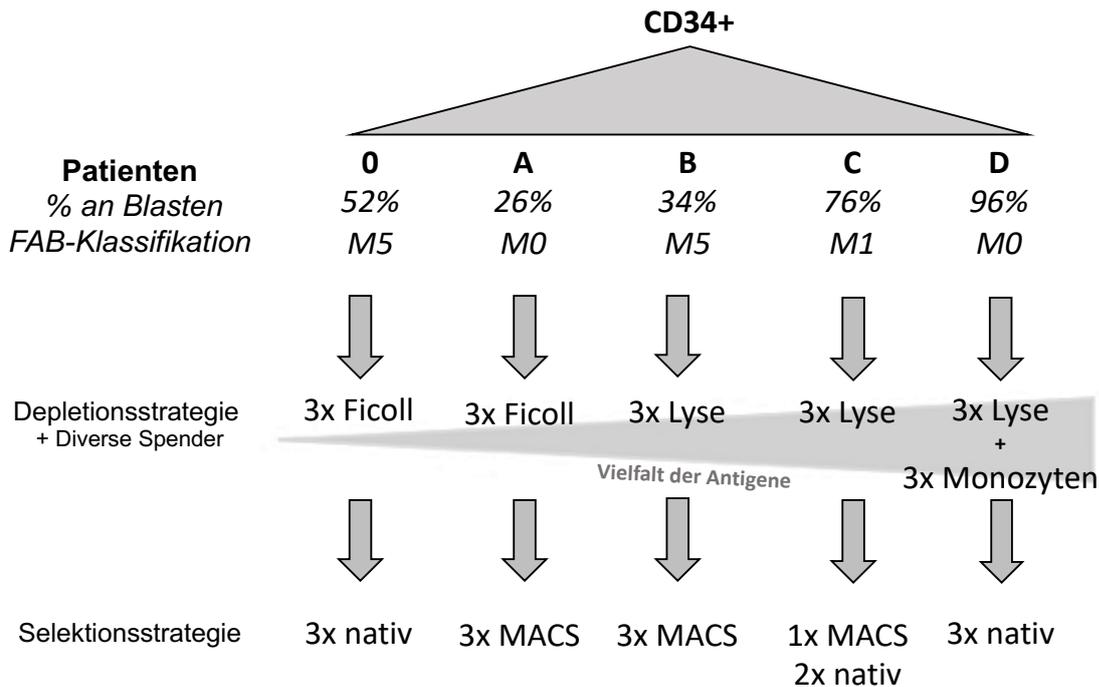


Abbildung 13: Übersicht der PD-Strategien

Das Diagramm zeigt die fünf getesteten PD-Strategien zur Gewinnung AML-spezifischer Binder. Alle verwendeten Patienten mussten dabei das Kriterium der Positivität für CD34 erfüllen (symbolisiert mit CD34+). – Die FAB-Klassifikation (siehe 1.1.5.1) ist jeweils unter den Patientenbezeichnungen bzw. prozentualen Anteilen der Blasten an allen Blutzellen nach Dichtegradientenzentrifugation angegeben, gefolgt von den verwendeten Depletions- sowie Selektionsstrategien. Für jeden Patienten wurde je eine individuelle Strategie etabliert, wobei insbesondere die prozentualen Anteile an Blasten relevant für die letztlich angewandte Strategie waren.

Patienten 0 und A erhielten zur Depletion in allen drei SR je via Ficoll-Hypaque gewonnene PBMC (Ficoll). Der Unterschied zwischen beiden bestand in der Selektionsstrategie, da aufgrund der um die Hälfte geringeren Blastenzahlen Patient A eine MACS-Aufreinigung (MACS) erhielt. Patient 0 wurde in allen drei SR stattdessen nativ (d.h. dichtegradientenzentrifugiert, kryokonserviert und letztlich aufgetaut) verwendet. Die Patienten B, C und D erhielten zur Depletion je erythrozytenlysierte gesunde Zellen (Lyse), wobei Patient D zusätzlich noch mit über Adhärenz angereicherten Monozyten in einem weiteren Schritt depletiert wurde (Monozyten). Zudem wurde Patient D aufgrund des Blastenanteils von 96 % nicht via MACS aufgereinigt, sondern nativ für die Selektion verwendet (vgl. Patient 0).

Zur Selektion wurden gleichfalls die Patienten B und C via MACS angereichert (vgl. Patient A). Dies wurde für Patient B in allen drei Runden, für Patient C nur in der ersten Runde durchgeführt, da ein Blastenanteil von 76 % für die 2. und 3. Selektionsrunde für diesen Patienten als ausreichend erachtet wurde und so Ressourcen schonend gearbeitet werden konnte. Die steigende Vielfalt an Antigenen durch die verschiedenen Depletionsstrategien ist durch eine aufsteigende, hellgraue Rampe im Hintergrund symbolisiert. Abkürzungen: MACS – magentic-activated cell sorting; Ficoll – Ficoll-Hypaque-Dichtegradientenzentrifugation; Lyse – Erythrozytenlyse; nativ – über Dichtegradientenzentrifugation angereicherte mononukleäre Zellen (d.h. inklusive Blasten) nach Kryokonservierung;

Alle Patientenzellen waren hierfür zunächst nach Dichtegradientenzentrifugation kryokonserviert und letztlich einen Tag vor Beginn der Selektion aufgetaut worden (siehe 2.6.1 sowie 2.6.3). Die durchgeführten PD-Taktiken unterschieden sich sowohl hinsichtlich der gewählten Depletions- als auch Selektionsstrategie.

Bezüglich Depletion wurden Patienten 0 und A mittels über Dichtegradientenzentrifugation (2.6.1) gewonnenen mononukleären Zellen, d.h. Lymphozyten und Monozyten, depletiert.

Patienten B, C und D wurden stattdessen mittels erythrozytenlysiertem Vollblut (2.6.8) depletiert, welches somit alle Zellpopulationen des peripheren Blutes enthielt. Zusätzlich wurde Patient D mit angereicherten Monozyten (2.6.9) depletiert, so dass hier eine Doppeldepletion stattfand.

Die Selektionsstrategien wiederum unterschieden sich bzgl. der Durchführung einer immunmagnetischen Separation (2.6.7, Patienten A, B und C), kurz MACS genannt, bzw. durch das Verwenden von nativen, d.h. nach Dichtegradientenzentrifugation kryokonservierten und wieder aufgetauten Primärzellen (2.6.3, Patienten 0, C und D).

Aufgrund des Blastenanteils von 76 % des Patienten C wurde hier lediglich zu Beginn der Selektion in der ersten und damit wichtigsten Selektionsrunde (1.3) die Blastenpopulation via CD34-MACS (2.6.7) aufgereinigt. Für die nachfolgenden beiden Runden wurde das native Material aufgrund des Blastenanteils von 76 % als ausreichend erachtet.

Pro Selektionsrunde wurden 10×10^6 Zellen pro Patient und eine entsprechend angepasste Anzahl an gesunden Blutspenderzellen benötigt. Waren nach Auftauen der AML-Zellen bzw. ihrer MACS-Aufreinigung weniger als 10×10^6 Zellen vorhanden, wurden alle verfügbaren Patientenzellen verwendet. Die Zahl der gesunden Blutspenderzellen wurde jedoch weiterhin auf 10×10^6 Zellen belassen. Es wurde überdies darauf geachtet, für einen männlichen AML-Patienten stets männliche Gesundblutspender und für weibliche AML-Spenderzellen stets weibliche Blutspenderzellen zu Depletion zur Verfügung zu stellen.

Die Adhärenzanreicherung der Monozyten ermöglichte im Verlauf der Selektionsrunden von Patient D eine zusätzliche Depletion auf je $2,5 \times 10^6$ aufgereinigten Monozyten pro Runde. Die Monozytendepletion wurde derjenigen auf erythrozytenlysiertem Blut direkt angeschlossen.

Zum Start des Panningprozederes wurden die am Vortag gefällten Phagen mit 250 µl 4 % MPBS (PBS mit Milchpulver versetzt) gemischt und mindestens 2 h auf einem Rotator geblockt. Gleichfalls wurden die immunseparierten bzw. nativen Patientenzellen in 500 µl 2 % MPBS resuspendiert und für mindestens 1 ½ h rotierend geblockt. Auch

die gesunden Spenderzellen, erythrozytenlysiert oder dichtegradientenzentrifugiert, wurden für jeweils 1 h versetzt mit 500 µl 2 % MPBS auf dem Rotator bei RT geblockt. Sofern auch auf Monozyten depletiert werden sollte, wurden diese gleichfalls mit 500 µl 2 % MPBS versetzt und bei 4 °C rotierend für ca. 1 ½ h geblockt.

Es erfolgte anschließend die Depletion. Hierfür wurde die geblockte Phagen-MPBS-Suspension zu den gesunden Spenderzellen gegeben, welche zuvor bei 2.600 rpm für 5 Min. abzentrifugiert wurden. Dieser Schritt diente dem Abfangen jener Phagen, die gesundes Blut erkennen würden. Seine Inkubationszeit belief sich auf 30 Min. rotierend bei RT. Nachfolgend wurde das Phagen-Spenderzellen-Gemisch bei 2.600 rpm für 5 Min. bei RT abzentrifugiert.

Falls eine Monozytendepletion gewünscht war, wurde die Zentrifugation bei 4 °C gemeinsam mit der Zentrifugation der geblockten Monozyten durchgeführt. Danach wurde der vordepletierte Überstand des Phagen-Spenderzellen-Gemisches zum Monozytenpellet gegeben und resuspendiert. Nachfolgend wurde gleichfalls für 30 Min. auf dem Rotator geblockt und bei 2.600 rpm für 5 Min. bei 4 °C abzentrifugiert.

War keine Monozytendepletion vorgesehen, entfiel dieser Schritt entsprechend und es wurde direkt mit der Selektion begonnen.

Auch die Patientenzellen wurden nach stattgehabter MPBS-Inkubation bei 2.600 rpm für 5 Min. zentrifugiert und je nach Selektionsstrategie entweder mit dem Überstand des Phagen-Spenderzellen-Gemisches (Patienten 0, A, B und C) oder dem Phagen-Spenderzellen-Monozyten-Überstand versetzt (Patient D).

Die jeweiligen an dieser Stelle verwendeten Überstände enthielten im Idealfall all diejenigen Phagenpartikel, die keine gesunden Blutzellen erkannt hatten. Durch Hinzufügen der Überstände zu den Patientenzellen wurde den Phagen mit AML-Antigenspezifität nun die Bindung an den Patientenblasten ermöglicht. Dieser Schritt stellte somit die Selektion AML-spezifischer Phagen dar.

Es erfolgte daraufhin eine Inkubation auf dem Rotator für 1 h bei RT mit nachfolgender Zentrifugation für 5 Min. bei 3.000 rpm.

Hieran schloss sich eine Waschung an. Diese Waschung nahm je Selektionsrunde an Härte bzw. Stringenz zu (vgl. 1.3.5.3). Der hierdurch ausgelöste Stress auf die gebundenen Phagen sollte eine noch bessere Auswahl an hochpotenten Phagen ermöglichen. Die Waschschritte waren für alle Strategien gleich (siehe Tabelle 8).

Nach der letzten Waschung erfolgte das Aufnehmen des phagengebundenen Blastenpellets in 50 µl PBS und hiernach in 500 µl TEA (Triethylamin), welches durch seinen pH von 12,2 die Patientenzellen lysierte. Die robusteren Phagen blieben trotz des extremen pHs intakt, so dass dieser Schritt die Elution der gebundenen Phagen von der Blastenoberfläche darstellte.

Das erhaltene Eluat wurde für 10 Min. auf dem Rotator inkubiert, wobei zur Neutralisation anschließend 500 µl Tris-HCl (pH = 7,5) hinzugegeben wurde. Somit konnte eine reine, von Zellen befreite Phagensuspension erhalten werden.

Selektionsrunde	1.	2.	3.
Reagenz	1 ml PBS	0,05 % Tween [®] 20 in 1ml PBS	0,05 % Tween [®] 20 in 1 ml PBS
Anzahl an Waschungen	10	10	15
Zentrifugation zwischen den Waschungen	3.000 rpm, 5 Min.	3.000 rpm, 5 Min.	3.000 rpm, 5 Min.

Tabelle 8: Waschstringenz

Dargestellt sind die Waschschritte der einzelnen Selektionsrunden inklusive verwendeter Reagenzien sowie Anzahl und Art der Zentrifugationen. Es wird ersichtlich, dass die Washhärte je Runde gesteigert wurde u.a. durch Verwendung härterer Reagenzien (z.B. Detergens Tween[®]20) sowie durch Erhöhung der Anzahl an Waschungen (Varianz zwischen 10 – 15 Waschungen pro Runde).

Parallel waren kompetente TG1 der OD 0,4 – 0,5 in 2xYT angesetzt worden, so dass nachfolgend eine Verdünnungsreihe zur Bestimmung des Output-Titers angelegt werden konnte (siehe 2.7.1.3). Auch hier wurde bei jeder Anzucht eine 2xYT-Agar^{AMP/KAN}-Kontaminationskontrolle angelegt (vgl. 2.7.1.3).

Nun konnte zu weiteren 15 ml dieser TG1 das Phageneluat hinzugefügt werden. Die Infektion der kompetenten Bakterien erfolgte zunächst für 30 Min. bei 37 °C ohne Schütteln, nachfolgend mit Schütteln bei 250 rpm und 37 °C für gleichfalls 30 Min. Nach Zentrifugation bei 4.500 g für 5 Min. bei RT wurde das Bakterienpellet in 200 µl 2xYT^{AMP/GLU} resuspendiert und auf einem großen 25 ml fassenden 2xYT-Agar^{AMP/GLU} ausplattiert, um über Nacht bei 37 °C bebrütet zu werden.

2.7.1.5 Tag 5, Kryokonservierung

Nach Berechnung des Output-Titers anhand der gewachsenen Kolonien der Verdünnungsreihe (siehe Formel 2) wurden die ausplattierten phagemidhaltigen TG1 mit je 1,5 ml 2xYT-Glycerol versetzt, von der Agarplatte abgeschabt und in Kryoröhrchen aliquotiert. Das Einfrieren erfolgte zunächst bei – 20 °C, die finale Lagerung bei – 80 °C. Insgesamt wurde das beschriebene Selektionsrundenschema pro Patient bzw. Strategie für je drei Selektionsrunden wiederholt.

2.7.2 Polyklonale Phagenanalyse – Testung des Phagenpools

Zur Überprüfung des Anreicherungs Erfolges nach drei Selektionsrunden wurde eine polyklonale FACS-Analyse durchgeführt, bei der jeder Patient mit dem auf ihm selektionierten Phagen-Output (syn. Phagenpool) auf eine Bindung getestet wurde.

Hierfür mussten die Output-Phagen aus den kryokonservierten Aliquots der Original-Bibliothek sowie der 1. bis 3. Selektionsrunden aller Patienten hergestellt werden. Die Herstellung erfolgte in Analogie der Tage 1 – 3 des allgemeinen Schemas (siehe 2.7.1), wobei der Hyperphage zur Infektion an Tag 2 verwendet wurde.

Nach Bestimmung der hergestellten CFU/ml mittels Verdünnungsreihe (siehe 2.7.1.3) wurden die Phagen zum Blocken so mit 4 % MPBS versetzt, dass alle Phagenpools auf denselben Titer von 5×10^9 CFU/ml eingestellt waren. Lediglich der Phagen-Output des Patienten C musste wegen zu geringen Titers auf $2,5 \times 10^9$ CFU/ml eingestellt werden. Das Blocken erfolgte hierbei rotierend für 2 h bei RT.

Nach Auftauen der nativen Patientenblasten wurden auch sie mit 2 % MPBS versetzt und nachfolgend für 1 ½ h rotierend geblockt. Pro FACS-Färbung kamen je 3×10^5 Zellen zum Einsatz.

Um die gebundenen Phagen im FACS letztlich messbar werden zu lassen, musste eine Dreifachfärbung durchgeführt werden (siehe Abbildung 14).

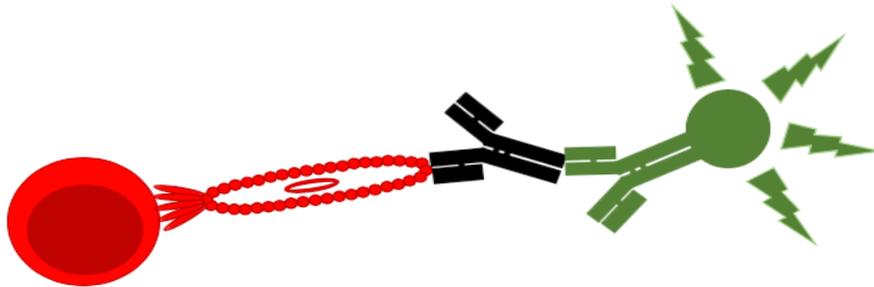


Abbildung 14: Schema einer Dreifachfärbung

Zur Detektion des zellgebundenen Phagens (1. AK) musste eine Dreifachfärbung in Anspruch genommen werden. So wurde der zellgebundene Phage (rot) durch den 2. AK anti-M13 (schwarz) geortet. Dieser 2. AK konnte zwar das Phagenhüllprotein pVIII binden, war jedoch ohne Fluorochromkoppelung, weshalb zur Detektion im FACS ein 3. AK die konstante Domäne des Maus-anti-M13 binden musste. Dieser 3. AK war goat-anti-mouse-Fitc (kurz: gamFitc, grün dargestellt), welcher an ein Fluorochrom gekoppelt war und damit die finale Messung ermöglichte.

Der Sekundär-AK zur Detektion der Phagen war hierbei gegen das Hüllprotein pVIII des Phagens gerichtet, im Folgenden anti-M13 genannt. Der unkonjugierte Maus-AK anti-M13 musste seinerseits mit einem Tertiär-AK gamFitc (goat-anti-mouse-Fitc) geortet werden, welcher die konstante Domäne des Maus-anti-M13-Antikörpers erkannte und durch sein Fluorochrom ein Signal im FACS verursachte.

Nach dem Blocken wurden letztlich je 100 µl Zellen mit 100 µl Phagensuspension versetzt, 60 Min. bei 4 °C inkubiert, nachfolgend mit 1 ml WP-FACS gewaschen und abzentrifugiert. Die Einstellung der Zentrifuge zwischen den einzelnen Färbeschritten betrug dabei jeweils 2.600 rpm für 5 Min. bei RT.

Darauffolgend wurde 100 µl anti-M13, 1 : 10.000 verdünnt in 2 % MPBS, hinzugegeben und 30 Min. bei 4 °C inkubiert. Nach Waschung mit WP-FACS und Zentrifugation erfolgte die Zugabe von 100 µl gamFitc in 1 : 50 2 % MPBS-Verdünnung. Auch hier wurde eine Inkubation für 30 Min. bei 4 °C mit nachfolgender Waschung in WP-FACS angeschlossen, ehe die Messung im konventionellen FACS durchgeführt wurde. Es wurde die Gatingstrategie für Dot Plots verwendet (vgl. 2.6.4.3).

2.7.2.1 Kontrollen

Als Positivkontrolle diente ein in einem früheren Projekt hergestellter und bereits als funktionstüchtig bestätigter Phage (laborinterne Nummer: FB-M1/B02). Da dieser jedoch auf der AML-Zelllinie Kasumi-1 hergestellt worden war und nur auf dieser sicher positiv gebunden hatte, wurde jene Zelllinie gemäß obigen Angaben behandelt und als Positivkontrolle mitgefärbt. Als Negativkontrolle diente die Färbung ohne Phagen, d.h. anti-M13 plus gamFitc, welche sowohl mit Kasumi-1 als auch mit den jeweiligen Patientenzellen durchgeführt wurde.

2.7.2.2 Auswertungskriterien

Zur positiven Bewertung des Anreicherungs Erfolges von Phagen auf dem Patientenmaterial wurden zwei Kriterien zugrunde gelegt.

Zum einen musste ein Anstieg um mindestens 75 % der Signalintensität der 3. Selektionsrunde im Vergleich zum Wert für die Original-Bibliothek vorhanden sein.

Zum anderen mussten mindestens 10 % der Patientenzellen positiv sein.

Erst bei Erfüllung beider Kriterien wurde ein Anreicherungs Erfolg beschieden und weitere Versuche durchgeführt.

2.7.3 Monoklonale Phagenanalyse – Massentestung individueller Phagen

Bei nachgewiesenem Anreicherungs Erfolg durch die polyklonale Analyse wurde eine monoklonale FACS-Analyse angeschlossen. Hierfür wurden in eine 96-well-Platte je 180 µl 2xYT^{AMP/GLU} vorgelegt, nachfolgend mittels autoklavierter Zahnstocher Einzelkolonien von den Agarplatten der Verdünnungsreihe gepickt und einzeln in die Wells übertragen.

Jede bakterielle Einzelkolonie trug dabei ein spezifisches Phagemid und war somit befähigt, nur einen einzigen Phagen zu produzieren. Durch separate Anzucht dieser Kolonien mit nachfolgender Phagenproduktion innerhalb einer jeden Vertiefung der 96-well-Platte war es möglich, die Spezifität von Einzelphagen als Reihentestung näher zu bestimmen. Auch hier galt das allgemeine Schema der Tage 1 – 3 (vgl. 2.7.1). Bedingt durch das 96-well-Format ergaben sich jedoch Abweichungen vom allgemeinen Schema, die nachfolgend erörtert seien.

Nach Picken der einzelnen Kolonien und Anzucht der Bakterien innerhalb der 96-well-Platten über Nacht bei 180 rpm und 37 °C, wurden 2 µl eines jeden Wells in eine neue Platte mit 180 µl vorgelegtem 2xYT^{AMP/GLU} pipettiert. Die über Nacht gewachsenen Platten wurden mit 30 µl Glycerol versetzt und bei – 80 °C als Masterplatten weggefroren, um ein reproduzierbares Backup der Einzelkolonien zu haben.

Die mit je 2 µl beladenen frischen Platten wurden währenddessen für 2 h bei 180 rpm und 37 °C wachsen gelassen.

Schließlich auf Eis im Wachstum abgestoppt, kamen je Well 30 µl einer 1 : 100 in PBS verdünnten Hyperphagenlösung hinzu, so dass die Platten nachfolgend bei 37 °C, 30 Min. ohne Schütteln, danach 30 Min. mit Schütteln bei 180 rpm inkubiert wurden.

Nach Zentrifugation bei 1.800 g bei 4 °C für 10 Min. wurde der Überstand der Wells verworfen und durch 2xYT^{AMP/KAN/IPTG} ersetzt. Durch Inkubation über Nacht bei 180 rpm und 30 °C fand die Phagenproduktion statt.

Für die Messung im FACS wurden die jeweiligen Patientenzellen aufgetaut, auf denen die zu testenden Phagen selektioniert worden waren. Pro Well wurden 1 x 10⁵ Zellen eingesetzt.

Parallel sollten auch gesunde Spenderzellen gemessen werden, für die dieselbe Zellzahl pro Well kalkuliert wurde. Je nachdem, wie die gesunden Spenderzellen während der patientenindividuellen PD-Depletionen bearbeitet worden waren, wurden die nun zu testenden gesunden Blutzellen auch behandelt. Dies bedeutet, dass für die Messung der Einzelphagen aus den Selektionen der Patienten 0 und A mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnene gesunde Zellen eingesetzt, indessen für die Patienten B, C und D erythrozytenlysierte Zellen verwendet wurden.

Alle verwendeten Zellen wurden vor Inkubation mit den Phagen mittels 2 % MPBS 1 ½ h rotierend geblockt. Nachfolgend wurde für jede zu testende Zellpopulation eine 96-well-Platte angelegt, in welche jeweils 30 µl der in 2 % MPBS-geblockten Zellen vorgelegt wurden.

Die über Nacht hergestellten Phagen wurden vor Gebrauch 10 Min. bei 1.800 g und 4 °C abzentrifugiert. Der so gewonnene phagenhaltige Überstand wurde dann in eine neue

Platte übertragen, nachfolgend 1 : 1 mit 4 % MPBS versetzt und schließlich für 2 h schüttelnd bei 180 rpm geblockt.

Danach wurden je 100 µl Phagen zu den je 30 µl Zellen pro Well hinzugefügt, so dass jeder Phage auf denjenigen Patientenzellen getestet werden konnte, auf denen er selektiert worden war. Zeitgleich erfolgte eine Testung desselben Phagens auf einer Probe gesunder Zellen. Somit wurde jeder Phage insgesamt zwei Mal gefärbt.

Die Inkubation der Phagen mit den Zellen erfolgte bei 4 °C für 1 h. Es schlossen sich eine Waschung mit 50 µl WP-FACS inkl. Zentrifugation bei 1.500 rpm für 5 Min. bei RT und eine erneute Waschung mit 150 µl WP-FACS je Well inkl. Zentrifugation (1.500 rpm, 5 Min., RT) an, ehe 30 µl einer 1 : 10.000 in 2 % MPBS verdünnte anti-M13-Lösung hinzugegeben wurde.

Hier erfolgte eine 30-minütige Inkubation bei 4 °C, ehe zunächst mit 100 µl WP-FACS und nachfolgend mit 150 µl WP-FACS gewaschen wurde. Die Zentrifugationen erfolgten hier gemäß den Waschungen zuvor, ehe je 30 µl einer 1 : 50 in 2 % MPBS verdünnten gamFitc-Lösung hinzugegeben wurden. Auch hier wurde 30 Min. bei 4 °C inkubiert, bevor sich dieselben Waschschriffe wie nach der anti-M13-Inkubation anschlossen.

Von diesen so gefärbten Zellen wurden je 75 µl in eine neue Platte übertragen und nachfolgend mit 225 µl WP-FACS zur Messung in der konventionellen Durchflusszytometrie versetzt.

Für jeden Patient wurden so je vier Platten gepaart mit jeweils einer Platte gesunder Spenderzellen getestet und analysiert. Die Gatingstrategie entsprach hierbei derjenigen für Histogramme (2.6.4.2).

2.7.3.1 Kontrollen

Als Positivkontrolle diente zum einen der Phage FB-M1/B02 (vgl. polyklonale Analyse (2.7.2)). Daher wurde auch hier zur Kontrolle die Zelllinie Kasumi-1 jeweils entsprechend den Angaben unter 2.7.3 behandelt und mitgefärbt.

Zum anderen dienten Phagen, welche im Verlauf dieser Arbeit gewonnen worden waren, als Positivkontrollen, wenn sie sich als der Kasumi-1-Kontrolle gleichwertig erwiesen hatten und damit sicher positiv auf den jeweiligen Patienten- und / oder gesunden Spenderzellen waren. Als Negativkontrolle wurde dieselbe Kontrolle, wie unter 2.7.2.1 beschrieben, verwendet.

2.7.3.2 Auswertungskriterien

Die Auswertungskriterien zur Auswahl und Weiterverfolgung einzelner Phagen waren in absteigender Reihenfolge ihrer Relevanz folgende:

1. Signal-to-noise-ratio:

$$(S/N) = \frac{\text{MFI (median fluorescence intensity) der positiven Zellen}}{\text{MFI der negativen Kontrollzellen}} \text{ (Invitrogen 2015)}$$

Formel 3: Signal-to-noise-ratio

- a. Bzgl. Patientenzellen
 - b. Bzgl. gesunder Spenderzellen
2. Prozentualer Anteil an positiven Patientenzellen
 3. Diversität der Histogramme

Hierbei waren keine strengen Cut-Off-Werte definiert worden, da eine Überprüfung des Titers der AK durch das 96-well-Format nicht möglich war. Durch Cut-Off-Werte wäre man Gefahr gelaufen, vielversprechende Phagenbindungen zu übersehen, sofern der Phage lediglich zu gering produziert worden wäre und damit eine zu schwache Positivität generiert hätte.

Daher wurden die Phagenbindungen untereinander und in vergleichender Zusammenschau aller drei Kriterien bewertet, ehe eine Sequenzierung durchgeführt wurde.

2.7.4 Einzelphagenanalyse – Testung titrierter individueller Phagen

Da eine Titrierung in den 96-well-Platten experimentell bedingt nicht möglich war, wurde nach erfolgter Auswahl (2.7.3) und Sequenzierung (2.8.4) eine Einzelphagentestung angeschlossen.

Hierbei wurden die einzelnen Phagen separat gemäß der Tage 1 – 3 des allgemeinen Schemas (vgl. 2.7.1) hergestellt, wobei der Hyperphage an Tag 2 zur Infektion verwendet wurde. Der Titer wurde dann mittels Verdünnungsreihe bestimmt und auf den gleichen Wert von 5×10^{10} CFU/ml titriert, um eine Vergleichbarkeit der Messungen zu gewährleisten.

Zur Testung wurden Patientenzellen der Patienten A, B, C und D eingesetzt, wobei A und B mittels CD34-MACS vor der Messung aufgereinigt wurden (siehe 2.6.7). Parallel sollten gesunde Spenderzellen getestet werden, welche zuvor erythrozytenlysiert wurden (2.6.8). Es wurden Zellzahlen zwischen $1,2 \times 10^5$ und 2×10^5 verwendet. Die Färbeschritte selbst und die Kasumi-1-Kontrolle erfolgten hierbei in Analogie zur Dreifachfärbung der polyklonalen Analyse (siehe 2.7.2). Die Auswertung wurde anhand der Gatingstrategie für Histogramme (2.6.4.2) vorgenommen.

2.7.4.1 Auswertungskriterien

Als Grundlage der Auswertung dienten zur besseren Differenzierung der unterschiedlichen Bindungseigenschaften zwei Kriterien.

Zum einen wurde ein Kriterium A eingeführt. Dieses teilte die Einzelphagen anhand des Anstiegs der MFI (vgl. 2.6.4.4) im Vergleich zur Kontrolle ein. Zum anderen wurde das Kriterium B aufgestellt, welches anhand des positiven Gates den prozentualen Anteil der positiven Zellen berücksichtigte. Die einzelnen Subklassen innerhalb dieser Kriterien sind Tabelle 9 zu entnehmen. Für eine positive Bewertung der Gesamtbindung mussten beide Kriterien mit mind. „+“ erfüllt sein.

Da im Rahmen der Auswertungen ersichtlich wurde, dass einige Einzelphagen MFI-Anstiege weit über 150 % generierten, wurde im Verlauf dieses Experimentes eine weitere Subklasse für das Kriterium A eingeführt. Diese Subklasse wurde als „stark“ betitelt und mit „s“ bezeichnet, sofern ein Anstieg von mind. 400 % zu verzeichnen war.

Kriterium A (MFI-Anstieg)		Kriterium B (% an positiven Zellen)	
Unter 75 %	-	Unter 10 % der Zellen	-
Um mind. 75 %	+	Mind. 10 % der Zellen	+
Um mind. 100 %	++	Mind. 50 % der Zellen	++
Um mind. 150 %	+++	Mind. 75 % der Zellen	+++

Tabelle 9: Kriterien A und B

Diese beiden im Rahmen der Einzelphagenanalyse eingeführten Kriterien finden in vorliegender Dissertation auch für die Auswertungen der Testung von Kreuzreaktivitäten auf diversen Zelllinien im konventionellen Durchflusszytometer (2.10.1) sowie das Kriterium A zur Analyse von AML-Primärzellen (2.12.1) und gesunden Blutspenderzellen (2.12.2) in der spektralen Durchflusszytometrie Anwendung. Abkürzungen: mind. – mindestens;

2.8 Molekularbiologische Methoden

2.8.1 Plasmidpräparation

Zur Extraktion von Plasmiden aus Bakterien wurde eine Plasmidpräparation durchgeführt. Hierfür wurde das QIAprep Spin Miniprep Kit gemäß Herstellerangaben verwendet. Als Ausgangsmaterial dienten jeweils über Nacht gewachsene Bakterienkulturen. Die Messung des Plasmidgehaltes nach Präparation erfolgte spektralphotometrisch mittels NanoDrop-Photometer (2.8.2). Die Lagerung der Plasmide fand bei – 20 °C statt.

2.8.2 Photometrische Messung von Nukleinsäure

Zur Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen wurde das Spektrophotometer NanoDrop1000 von Thermo Fisher Scientific verwendet. Zusätzlich wurde stets die

Reinheit mittels Messung des Verhältnisses $\frac{\text{OD 260 nm (Nukleinsäureabsorption)}}{\text{OD 280 nm (Proteinabsorption)}}$ bestimmt.

Dieses sollte im Bereich zwischen 1,8 – 2,0 liegen, welches für eine hochreine, d.h. möglichst proteinfreie Nukleinsäurelösung sprach (Mülhardt 2013).

2.8.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die Methodik der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beschreibt die Vervielfältigung von DNA-Fragmenten, sog. Templates, durch drei klassische Schritte (Mülhardt 2013):

1. Denaturierung, d.h. Auftrennen des DNA-Doppelstranges
2. Annealing, d.h. Anlagerung der Startsequenzen, sog. Primer, für die Polymerase
3. Elongation, d.h. Vervielfältigung der DNA durch das Enzym Polymerase

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurden PCR im Rahmen der Sanger-Sequenzierung (2.8.4), der ortsspezifischen Mutagenese des pIT2-Inserts (2.8.5) und der Kolonie-PCR (2.8.7) durchgeführt. Es wurden stets eine Positivkontrolle in Form eines bereits bekannten DNA-Fragmentes sowie eine Negativkontrolle (hier: PCR-Wasser) mitgeführt.

2.8.4 Sanger-Sequenzierung

Die Sanger-Sequenzierung ist eine molekularbiologische Technik, welche das Auslesen der Basenfolge eines DNA-Stranges erlaubt. Sie beruht auf der Vervielfältigung der interessierenden DNA mittels konventionellen dNTP (Desoxynukleotiden) sowie fluoreszierenden ddNTP (Didesoxynukleotiden) im Rahmen einer PCR mit nachfolgender gelelektrophoretischen Auftrennung (Buselmaier und Haussig 2018).

Durch das Ansetzen der PCR mit dNTP und ddNTP können amplifizierte Fragmente unterschiedlicher Längen erhalten werden. Der Grund hierfür liegt in den fluoreszierenden ddNTP, denen ein Sauerstoffmolekül am 3'-Ende fehlt, welches eigentlich zur weiteren Elongation des wachsenden DNA-Stranges notwendig wäre. Da dieses Sauerstoffmolekül jedoch fehlt, kommt es zum Kettenabbruch bei Einbau eines ddNTP (Buselmaier und Haussig 2018). Da der Einbau des ddNTP zudem zufällig geschieht, bilden sich Fragmente unterschiedlicher Länge aus.

Beim Auslesen des PCR-Produktes durch eine kapilläre Gelelektrophorese werden die Fragmente anhand ihrer Größe geordnet und schließlich das durch einen Laser angeregte, fluoreszierende ddNTP in einem Elektropherogramm dargestellt. Anhand dieses Elektropherogramms kann die Basenabfolge nun abgelesen werden (Buselmaier und Haussig 2018).

In nachfolgender Tabelle 10 sind sowohl die PCR-Geräteeinstellungen als auch der PCR-Ansatz der Sequenzierungs-PCR dargestellt.

Zeit	Temperatur	Zyklen	Schritt	PCR-Ansatz	Volumen
60 Sek.	96 °C	1	Primäre Denaturierung	Big Dye Puffer	2 µl
10 Sek.	96 °C	25	Denaturierung	Big Dye Mix	1 µl
5 Sek.	50 °C		Annealing	3'-Primer oder 5'-Primer (siehe 2.3.1)	1,5 µl
75 Sek.	60 °C		Elongation	PCR-H ₂ O	4,5 µl
∞	4 °C	1	Halteposition	Template	1 µl

Tabelle 10: Ansatz und Einstellungen der Sequenzierungs-PCR

Nach abgelaufener PCR wurden die Produkte nachfolgend via DyeEx 2.0 Spin Kit oder DyeEx 96 Kit (beide von Qiagen) gemäß Herstellerangaben aufgereinigt.

Nach Vorlage von 10 µl Formamid in eine 96-well-Sequenzierplatte wurden 10 µl aufgereinigtes PCR-Produkt hinzugegeben und die Kapillarsequenzierung gestartet.

In vorliegender Arbeit wurde die Sanger-Sequenzierung zum einen zur Auswertung der monoklonalen Klonanalyse (siehe 2.7.3) benötigt, um mehrfach vorhandene Sequenzen zu identifizieren. Zum anderen musste im Zuge der ortsspezifischen Mutagenese (2.8.5) die korrekte Mutation und nachfolgend im Rahmen der Klonierung in den pMS2-Vektor (2.8.9) das erfolgreiche Einbringen des scFv-Inserts überprüft werden.

2.8.4.1 Externe Sequenzierung

Nach mehrfacher Sequenzierung der in den pMS2-Vektor klonierten Inserts 11, 14 und 33 konnte hausintern kein zufriedenstellendes Sequenzierergebnis gewonnen werden. Daher wurden diese drei Sequenzen extern bei Eurofins Genomics mit folgender Referenz nachsequenziert: DNA sequencing order 11104177499-1 (PO#: Ap/17-004845).

2.8.5 Ortsspezifische Mutagenese

Zur Herstellung des selektierten Proteins musste, wie unter 1.3.3.1 erörtert, das Ambercodon TAG in das Glutamin codierende Triplet CAG umgewandelt werden. Dieses Codon hatte in dem für die Phagenexperimente verwendeten Suppressorstamm TG1 (Gen: glnV (supE), siehe 6.2.11) für ein funktionstüchtiges Protein translatieren können. Da im Folgenden jedoch die Expression in anderen Zellen resp. Vektoren geplant war, musste eine ortsspezifische Punktmutation in die CDR2-Region der schweren Kette (siehe 1.2.1) eingefügt werden.

Hierfür wurden mittels der Software LasergeneCoreSuite spezifische Primer erstellt (siehe 2.3.2), welche diese Region mit ihren Sequenzen abdeckten und durch Basenaustausch ein Glutamin-Codon einbauten. Da die Sequenzen der CDR2-V_H der Inserts 14, 22 und 44 identisch waren, wurde derselbe Mutagenese-Primer verwendet. Auch konnte für die Inserts 24 und 35 an dieser Stelle eine Sequenzgleichheit beobachtet werden, so dass ebenso ein gemeinsamer Mutagenese-Primer erstellt werden konnte (2.3.2).

Zum Einfügen der Punktmutation mussten die zuvor über eine Präparation (2.8.1) gewonnenen Plasmide mittels der Mutagenese-AML_WT-Primer (2.3.2) amplifiziert werden. In Tabelle 11 sind die hierfür gewählten Geräteeinstellungen zur PCR und Ansätze der Reagenzien abgebildet. Je PCR-Ansatz wurden 5 µl Plasmid-DNA der Konzentration 10 ng/µl zugesetzt.

Die Verwendung der pfu-Polymerase anstelle der taq-Polymerase nutzte zudem deren Fehlerkorrektur-Aktivität (3'-5'-Exonuklease-Aktivität), um eine höchstmögliche Genauigkeit der Amplifikation und damit der Mutagenese zu erzielen (Mülhardt 2013).

Zeit	Temperatur	Zyklen	Schritt	PCR-Ansatz	Volumen
1 Min.	95 °C	1	Primäre Denaturierung	10 x Puffer	5 µl
1 Min.	95 °C	12	Denaturierung	dNTP	0,5 µl
1 Min.	55 °C		Annealing	3'-AML_WT-Primer	1 µl
6,5 Min.	72 °C		Elongation	5'-AML_WT-Primer	1 µl
6,5 Min.	72 °C	1	Letzte Elongation	pfu-Polymerase	1 µl
∞	4 °C	1	Halteposition	PCR-H ₂ O	36,5 µl

Tabelle 11: Ansatz und Einstellungen der Mutagenese-PCR

Nach abgelaufener Mutagenese-PCR wurde zudem ein Verdau angeschlossen, um die methylierte Bakterien-DNA aus dem Produkt eliminieren zu können. Hierfür wurde das Enzym DpnI verwendet, welches methylierte Strukturen erkannte (ten Haaf 2015).

Da die ortsspezifisch mutierte DNA nicht methyliert war, wurde jene nicht erkannt und blieb intakt. Anders verhielt es sich mit der unmutierten DNA, welche noch in Bakterien hergestellt worden war und damit den Syntheseapparat des Eukaryoten inkl. seiner

Methylierungsmaschinerie durchlaufen hatte (ten Haaf 2015), diese DNA wurde geschnitten.

Nach Zugabe von je 1 µl Dnpl, entsprechend der Aktivität von 10 U, und 1-stündiger Inkubation bei 37 °C erfolgte eine Hitzeschocktransformation in den E. coli-Stamm XL1-Blue (siehe 2.8.6). Hierfür wurden je 5 µl des DpnI-Verdau eingesetzt.

2.8.6 Hitzeschocktransformation in XL1-Blue

Zur Hitzeschocktransformation von Plasmiden in den E. coli-Stamm XL1-Blue wurden 50 µl der Bakterien mit 0,9 µl Mercaptoethanol versetzt und 10 Min. auf Eis inkubiert.

Nachfolgend wurden 5 ng des jeweils gewünschten Plasmids hinzugefügt und erneut 30 Min. auf Eis inkubiert. Durch rasches Eintauchen in ein 42 °C heißes Wasserbad für exakt 45 Sek. und Abkühlen des Gemisches für 2 Min. auf Eis wurde das Einbringen des Plasmids in das bakterielle Zytoplasma finalisiert.

Nachfolgend wurden die Bakterien mit 950 µl SOC-Medium (siehe 6.2.9) versetzt und für 1 h bei 250 rpm und 37 °C inkubiert. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 4.500 rpm, 5 Min. inkl. Resuspension in 100 µl 2xYT^{AMP/GLU}, ehe die Zellen auf einem 2xYT-Agar^{AMP/GLU} ausplattiert und über Nacht bei 37 °C bebrütet wurden.

2.8.7 Kolonie-Polymerase-Kettenreaktion

Die Kolonie-Polymerase-Kettenreaktion (Kolonie-PCR) stellt eine Modifikation der herkömmlichen PCR (2.8.3) dar. Der Unterschied besteht im Ausgangsprodukt der Kolonie-PCR, welches eine direkt auf Agar gewachsene Bakterienkolonie ist.

Nach Auftragen des daraufhin amplifizierten PCR-Produktes auf ein Agarosegel und Vergleich mit einem Größenmarker kann so rasch vor Durchführung weiterer zeit- und materialaufwändiger Arbeitsschritte überprüft werden, ob sowohl Plasmid wie Insert nach z.B. einer Transformation in der Kolonie vorhanden sind.

Hierfür wurde nun für jede getestete Kolonie je 5 ml 2xYT^{AMP/GLU} und jeweils ein PCR-Tube vorbereitet. Dieses enthielt bereits die PCR-Reagenzien (siehe Tabelle 12).

Nachfolgend wurden die zu überprüfenden und über Nacht auf einer Agarplatte gewachsenen Kolonien jeweils einzeln mittels Pipettenspitze gepickt und zunächst in eines der PCR-Tubes getaucht. Im Anschluss wurde die Bakterien tragende Pipettenspitze in das vorbereitete Medium abgeworfen.

Die so beimpften Medien wurden über Nacht bei 37 °C und 250 rpm weiterkultiviert, um bei nachgewiesenem Insert einer Plasmidpräparation (2.8.1) unterzogen werden zu können. Des Weiteren wurde ein Glycerolstock als Backup angelegt, indem 100 µl Bakterien zu 400 µl Glycerol gemischt und bei – 80 °C eingelagert wurden.

Zeit	Temperatur	Zyklen	Schritt	PCR-Ansatz	Volumen
10 Min.	95 °C	1	Primäre Denaturierung	10 x Puffer	5 µl
30 Sek.	95 °C	30	Denaturierung	MgCl ₂	3 µl
30 Sek.	55 °C		Annealing	dNTP	0,5 µl
2 Min.	72 °C		Elongation	3'-Primer	1 µl
10 Min.	72 °C	1	Letzte Elongation	5'-Primer	1 µl
∞	4°C	1	Halteposition	taq-Polymerase	0,25 µl

Tabelle 12: Ansatz und Einstellungen der Kolonie-PCR

Das beimpfte PCR-Tube wurde indessen, wie in Tabelle 12 dargestellt, amplifiziert. Wie bei allen PCR dieser Arbeit wurde sowohl eine Positivkontrolle in Form eines bereits bekannten Plasmids als auch eine Negativkontrolle bestehend aus PCR-H₂O mitgeführt. Falls erforderlich wurde eine Aufreinigung mittels QIAquick PCR Purification Kit gemäß Herstellerangaben angeschlossen.

Zur Überprüfung eingebrachter Sequenzen wie z.B. der Punktmutation nach ortsspezifischer Mutagenese (2.8.5) oder des korrekt eingefügten Inserts in den pMS2-Vektor (2.8.9) wurde nach Durchführung und Aufreinigung des Kolonie-PCR-Produktes zudem eine Sequenzierung (2.8.4) angeschlossen.

2.8.8 Agarosegelelektrophorese

Eine Agarosegelelektrophorese wurde zur Größenauftrennung von negativ geladenen DNA-Fragmenten in einem angelegten elektrischen Feld verwendet. Ein hierbei mitlaufender Marker zeigte die DNA-Größe bezogen auf die Laufweite der Fragmente an (Mülhardt 2013).

Hierfür wurde zunächst 1,5 g Agarose mit 100 ml 1xTAE (siehe 6.2.8) in einer Mikrowelle erwärmt, nachfolgend 10 µl GelRed oder 5 µl Ethidiumbromid hinzugegeben und letztlich in eine Elektrophoresekammer gegossen. Nach Erkalten des Gemisches wurden das fertige Gel mit 1xTAE überschichtet, Proben sowie Größenmarker zum Beschweren mit 6x Ladepuffer versetzt und die Taschen des Gels beladen. Die angelegte Spannung belief sich auf 120 V. Die Laufzeit betrug ca. 45 Min.

Durch den Interkalator GelRed bzw. Ethidiumbromid konnten die nach Größe getrennten DNA-Banden über einem UV-Tisch sichtbar gemacht und beurteilt werden. Sofern für

weitere Verarbeitungsschritte die PCR-Produkte weiterhin benötigt wurden, wurden jene zügig auf dem UV-Tisch ausgeschnitten und mittels des JETQUICK Gel Extraction Spin Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die Lagerung der aufgereinigten Produkte erfolgte schließlich bei – 20 °C.

2.8.9 Klonierung in den pMS2-Vektor

Zur Klonierung der scFv-Inserts in den pMS2-Vektor mussten sowohl der pMS2 als auch der noch Insert tragende pIT2-Vektor mittels der Restriktionsenzyme NotI und SfiI verdaut werden. 1 µg eines jeden der Vektoren wurde hierfür in 2,5 µl Puffer aufgenommen und nachfolgend mit je 1 µl NotI versetzt. Es erfolgte eine Inkubation bei 37 °C für 15 Min., ehe 1 µl SfiI hinzugefügt wurde und sich eine Inkubation bei 50 °C für 15 Min. anschloss.

Der pMS2-Vektor wurde daraufhin zur Verhinderung seiner Religation durch Entfernung seines 5'-Phosphatrestes (ten Haaf 2015) mit 1 µl Antarktischer Phosphatase für 45 Min. bei 37 °C inkubiert und anschließend für 20 Min. bei 65 °C hitzeinaktiviert.

Der verdaute pIT2-Vektor und das nun freie Insert wurden stattdessen ausschließlich bei 65 °C für 20 Min. hitzeinaktiviert.

Zur Auftrennung der gewonnenen DNA-Fragmente wurde anschließend eine Agarosegelelektrophorese (2.8.8) durchgeführt. Als Kontrollen dienten der unverdaute Vektor sowie der reguläre Größenmarker. Anhand der Laufweite als Indikator für die Basenpaaranzahl und damit der Größe der Fragmente konnten nachfolgend Insert (733 bp) und benötigter pMS2-Vektor (7488 bp) erkannt, aus dem Gel ausgeschnitten und wie unter 2.8.8 beschrieben aufgereinigt werden. Hernach erfolgte die photometrische Messung des DNA-Gehalts (2.8.2).

Zur Ligation beider DNA-Fragmente wurden daraufhin 50 ng des dephosphorylierten pMS2-Vektors eingesetzt. Die erforderliche Menge des Inserts wurde mit folgender Formel berechnet (ten Haaf 2015):

$$\frac{[bp] \text{ Insert}}{[bp] \text{ Vektor}} \times [ng] \text{ Vektor} \times 10 = [ng] \text{ an benötigtem Insert}$$

Formel 4: Berechnung der Menge an Insert zur Klonierung in den pMS2-Vektor

Der Faktor 10 in obiger Gleichung zeigt hierbei an, dass mit 10-fachem Überschuss des Inserts gearbeitet wurde.

Zunächst wurden Insert und Vektor gemeinsam mit PCR-Wasser gemischt und für 10 Min. auf Eis inkubiert. Danach wurden T4-Ligase-Puffer sowie das Enzym T4-Ligase hinzugefügt und 60 Min. bei RT inkubiert, wodurch die Ligation der beiden DNA-

Fragmente eingeleitet wurde. Die Inaktivierung der T4-Ligase geschah anschließend bei 65 °C für 10 Min.

Das ligierte Plasmid wurde daraufhin in den E. coli-Stamm XL1-Blue gemäß 2.8.6 transformiert. Nach erfolgter Transformation wurde eine Kolonie-PCR (2.8.7) durchgeführt. Auch bei dieser Kolonie-PCR erfolgte eine Aufreinigung des PCR-Produktes mit nachfolgender Messung des DNA-Gehalts (2.8.2) und Sequenzierung (2.8.4). Die Klone 11, 14 und 33 wurden dabei zusätzlich extern überprüft (2.8.4.1). Eine Lagerung der gewonnenen PCR-Produkte geschah bei – 20 °C.

Parallel zur PCR wurde außerdem eine Kultivierung der transformierten Bakterien bei 37 °C und 250 rpm über Nacht in 2xYT^{AMP/GLU} mit anschließender Plasmidpräparation durchgeführt (2.8.1). Für jede Bakterienkultur wurde dabei gleichfalls ein Glycerolstock als Backup angelegt, indem 100 µl Bakterien mit 400 µl Glycerol gemischt bei – 80 °C kryokonserviert wurden.

2.8.10 Transfektion von HEK293T-Zellen

Zur Expression des scFv-Fc wurde die eukaryotische Zelllinie HEK293T verwendet, welche mittels Lipofektion zur Aufnahme des klonierten pMS2-Vektors gebracht wurde. Hierfür wurden je 5×10^4 Zellen auf einer Kulturplatte in 1 ml RPMI + 10 % FBS + 1 % P/S ausplattiert, so dass nach eintägiger Kultur ungefähr 80 % Konfluenz erzielt werden konnte.

Vor Beginn der Transfektion wurden alle Reagenzien auf RT gebracht und die DNA auf 200 ng/µl mittels Verdünnung in PCR-H₂O eingestellt.

Pro Ansatz wurde daraufhin die 2,5-fache Menge an FuGENE® HD zur Plasmid-DNA hinzugegeben, das Gesamtvolumen mittels reinem RPMI auf 100 µl pro Ansatz aufgefüllt und eine Inkubation von 15 Min. bei RT durchgeführt. Hierbei bildeten sich Lipidkomplexe, die letztlich die Aufnahme des Gemisches durch die HEK293T-Zellen erleichtern sollten (ten Haaf 2015).

Anschließend wurde das Gemisch so auf die HEK293T-Zellen aufgetropft, dass pro Ansatz 400 ng Plasmid-DNA je Well enthalten waren und die Zellen nachfolgend bei 37 °C weiterkultiviert werden konnten.

Sowohl an Tag 2 wie an Tag 3 der Kultur erfolgte ein Mediumwechsel. An Tag 3 wurde zudem die Transfektionseffizienz im FACS überprüft, wobei die GFP-Sequenz des pMS2-Vektors ausgenutzt wurde, da so alle erfolgreich transfizierten Zellen ohne weiteres Fluorochrom bestimmt werden konnten (vgl. 2.4.2).

Hierzu wurden 500 µl der Zellen 5 Min. bei 500 g zentrifugiert, ehe sich eine Waschung in 1 ml WP-FACS mit erneuter Zentrifugation bei 500 g für 5 Min. mit Resuspension in 500 µl WP-FACS anschloss. Die Messung erfolgte letztlich im konventionellen

Durchflusszytometer (2.6.4). Die Gatingstrategie war die für Histogramme (2.6.4.2). Zur Kontrolle dienten nicht transfizierte HEK293T-Zellen.

Um die Effizienz weiter zu steigern, wurde nachfolgend ein Selektionsdruck mittels zeocinhalten Mediums (100 µg/ml Zeocin in RPMI + 10 % FBS + 1 % P/S) appliziert. Durch die Zeocin-Resistenz des pMS2-Vektors konnten so nur die Plasmid tragenden Zellen überleben.

Nach derartiger Kultivierung über drei Wochen wurde die finale Transfektionseffizienz erneut durch FACS-Kontrollen, wie oben beschrieben, ermittelt.

Nachfolgend wurde nach jedem Mediumwechsel (alle 5 – 7 Tage) der scFv-Fc-haltige Kulturüberstand abgenommen, bei 3.000 rpm für 10 Min. bei 4 °C zentrifugiert und bei 4 °C für weitere funktionelle Versuche gelagert. Außerdem wurde zur Überprüfung der korrekten Produktion eine SDS-PAGE (siehe 2.9.1) inkl. eines Westernblots angeschlossen. Zeitgleich wurden Backups der erfolgreich transfizierten HEK293T-Zellen kryokonserviert (2.6.3).

2.9 Proteinbiochemische Methoden

2.9.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Überprüfung des Überstands der transfizierten HEK293T auf das Vorhandensein der scFv-Fc fand eine SDS-PAGE mit anschließendem Westernblot Anwendung. Insgesamt wurden drei derartige Nachweise geführt.

Die SDS-PAGE diente hierbei der Größenauftrennung von zuvor denaturierten und mit negativ beladenem Natriumdodecylsulfat (SDS) versehenen Proteinen durch Wanderung in einem elektrischen Feld (Rehm und Letzel 2016). Hierfür wurden zunächst die Proben 1 : 1 mit NuPAGE® LDS Sample Buffer (4X) versetzt, nachfolgend für 10 Min. bei 70 °C zur Denaturierung der Proteine inkubiert und letztlich in die Taschen des jeweils verwendeten Gels geladen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Bolt™ 8 % Bis-Tris Plus Gele mit NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (20X) sowie NuPAGE® 4 - 12 % Bis-Tris-Gele mit NuPAGE® MES SDS Running Buffer (20X) als jeweilige Laufpuffer in der Elektrophoresekammer verwendet. Die Einstellung der Kammer lag bei 200 V für 50 - 60 Min.

Als Negativkontrolle diente ein nicht transfizierter Überstand. Als Positivkontrolle wurde ein im Labor bereits erfolgreich hergestelltes scFv-Fc verwendet. Das Molekulargewicht wurde anhand eines parallel aufgetragenen Gewichtsmarkers bestimmt. Zum Nachweis des NiNTA-Aufreinigungserfolgs mit nachfolgender Coomassie-Färbung wurde allein der Molekulargewichtsmarker mitgeführt (siehe 6.12, 6.11).

2.9.1.1 Berechnung des Molekulargewichts

Die jeweiligen Molekulargewichte der aufgetrennten Proteine wurden mithilfe der öffentlich zugänglichen Website <http://www.sciencegateway.org/tools/proteinmw.htm> ermittelt. Für das monomere scFv-Fc wurden hierbei 59 kDa, für das alleinige scFv-Insert 25 kDa und für den Platzhalter des leeren pMS2-Vektors 14 kDa bestimmt.

2.9.2 Westernblot

Nach der elektrophoretischen Auftrennung mittels SDS-PAGE (siehe 2.9.1) erfolgte das Übertragen der Proteine auf eine Blottingmembran aus Polyvinylidenfluorid durch erneutes Anlegen eines elektrischen Feldes. Durch Inkubation mit einem detektierenden Antikörper, welcher mit einem Enzym gekoppelt war, konnte so das interessierende Protein mittels Chemilumineszenz (ECL) sichtbar gemacht werden (Mülhardt 2013).

Hierfür wurde die Membran durch kurzes Schwenken in Methanol aktiviert, ehe sie gemeinsam mit dem Polyacrylamidgel zur Übertragung der Proteine in die Blottingapparatur für 45 Min. bei 100 V gestellt wurde. Währenddessen wurde die gesamte Blottingapparatur mittels Eis von allen Seiten gekühlt.

Zur Überprüfung des erfolgreichen Transfers auf die Membran wurde daraufhin eine Ponceau-S-Färbung der Membran durchgeführt. Ponceau S ist ein Farbstoff, welcher selbst negativ geladen und damit fähig ist, sich vollständig reversibel an positiv geladene Aminogruppen der Proteine anzulagern (Ashish und Das 2014). Dies verursacht eine Rotfärbung der Proteinbanden, sofern sie korrekt auf die Membran transferiert wurden. Die Membran wurde daher in 20 ml Ponceau S leicht schwenkend für 2 Min. gefärbt.

Nach erfolgreicher Kontrolle, d.h. Sichtbarwerden der Proteinbanden, wurde mit der weiteren Bearbeitung der Membran begonnen. Dazu wurde selbige zunächst in TBST (Tris-buffered saline mit 0,1 % Tween[®]20) für 2 Min. schwenkend von der Ponceau-S-Lösung befreit und nachfolgend 1 h in TBST-M (TBST mit 5 % Milchpulver) unter sanftem Schwenken auf einem Schüttler geblockt. Daraufhin erfolgte die Detektion des Maus-Fc-Teils des scFv-Fc durch einen 1 : 5.000 in TBST-M verdünnten Sekundärantikörper, anti-Maus-HRP genannt. Dieser Sekundär-AK war gekoppelt an eine Meerrettichperoxidase (HRP, horseradish peroxidase), welche durch Umsetzung ihres Substrates die Chemilumineszenz induzierte (Mülhardt 2013).

Auch mit dem anti-Maus-HRP-Gemisch erfolgte eine Inkubation für 1 h. Es schloss sich eine Waschung mit TBST für 5 Min. unter leichtem Schwenken an. Diese Waschung wurde fünf Mal wiederholt.

Nachfolgend wurde die Membran mit der Chemolumineszenzlösung ECL[™] Prime Western Blotting Detection Reagent versetzt und zügig mit dem Programm ChemoStar ausgewertet.

2.9.3 Weitere Proteinnachweismethoden

Zum Nachweis der korrekt hergestellten scFv-Fc-Fusionsproteine fanden in vorliegender Arbeit noch weitere Methoden (z.B. eine Massenspektrometrie nach erfolgreicher NiNTA-Aufreinigung) Anwendung. Diese Methoden stellen eine Bestätigung des Westernblots dar und weisen die endgültige Identität und Integrität der Proteine nach. Sie sind im Anhang dieser Arbeit zur weiterführenden Lektüre einzusehen (siehe 6.9 bis 6.13).

2.10 Analyse der scFv-Fc in der konventionellen Durchflusszytometrie

Die Funktionsweise der konventionellen Durchflusszytometrie wurde bereits unter 2.6.4 dargelegt. Während der Analysen der scFv-Fc wurde sie für Versuche mit Zelllinien verwendet. Die Zellreihe Kasumi-1 hatte sich hierbei als bindungspositiv für die meisten der selektionierten scFv-Fc erwiesen (siehe 6.6.1), weshalb diese Zelllinie für alle funktionellen Versuche Anwendung fand.

2.10.1 Überprüfung von Kreuzreaktivitäten

Zur Überprüfung etwaiger Kreuzreaktivitäten der scFv-Fc wurden sie auf acht verschiedenen Zelllinien (6.2.12) getestet. Hierfür wurden pro Färbung 250.000 Zellen der jeweiligen Zelllinien eingesetzt. Alle sieben scFv-Fc wurden auf Bindung auf allen Zelllinien überprüft.

Entsprechende Zellzahlen der Zelllinien wurden dazu in 10 % AB-Serum für 10 Min. bei RT geblockt, um nachfolgend mit je 1 ml WP-FACS versetzt bei 500 g für 5 Min. gewaschen zu werden. Jeder Färbungsansatz wurde mit je 100 µl scFv-Fc-haltigem HEK-Überstand versehen und für 30 Min. bei 4 °C inkubiert.

Nach erneuter Waschung bei 500 g für 5 Min. mit WP-FACS wurden die Pellets in je 100 µl 1 : 50 Verdünnung von gamFitc in WP-FACS resuspendiert und erneut bei 4 °C für 30 Min. inkubiert. Es erfolgte anschließend ein Waschen in WP-FACS bei 500 g für 5 Min. mit nachfolgender Aufnahme in WP-FACS zur Messung im konventionellen FACS.

Zur Kontrolle wurde, wie unter 2.6.4.1 beschrieben, nicht transfizierter Überstand plus gamFitc als Negativkontrolle sowie ein in früheren Arbeiten hergestelltes, funktionales scFv-Fc als Positivkontrolle verwendet. Als Gatingstrategie wurde diejenige für Histogramme eingesetzt (2.6.4.2).

2.10.1.1 Auswertungskriterien

Es wurden dieselben zwei Auswertungskriterien A und B, die auch der Einzelphagenanalyse zugrunde gelegt wurden, verwendet (siehe 2.7.4.1). Für eine positive Bewertung der Gesamtbindung mussten auch bei diesem Experiment beide Kriterien mit mind. „+“ erfüllt sein.

2.10.2 Trypsinierung

Zur Eingrenzung der potentiellen Oberflächenzielantigene wurde ein Trypsinierungsversuch durchgeführt. Hierzu wurde die Modellzelllinie Kasumi-1 verwendet und pro Ansatz 1 Million Zellen eingesetzt.

Nach einmaligem Waschen der Zellen in PBS für 5 Min. bei 1.500 rpm wurden die Zellen entweder 15 Min. oder 30 Min. in PBS oder 0,25 % Trypsin-EDTA bei 37 °C inkubiert. Nach abgelaufener Inkubationszeit wurden alle Ansätze mit 10 ml RPMI versetzt, um die Trypsinierung zu beenden. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation bei 1.200 rpm für 5 Min. bei RT. Schließlich wurden je 100 µl HEK-Überstände der zu testenden AK 11, 22, 24 und 35 hinzugegeben und für 30 Min. bei 4 °C inkubiert.

Nach erneutem Waschen in 1 ml WP-FACS bei 2.400 rpm für 5 Min. wurde je 100 µl 1 : 50 gamFitc-WP-FACS-Verdünnung hinzugefügt und auch dieses bei 4 °C für 30 Min. inkubiert. Nach erneuter Waschung für 5 Min. bei 2.400 rpm erfolgte die Messung der Fluoreszenzen.

Da Trypsin eine Protease ist, wurde ein Rückgang des Fluoreszenzsignals im Vergleich zu den in PBS inkubierten Zellen bzw. ein stärkerer Rückgang mit längerer Dauer der Inkubation mit Trypsin erwartet, sofern das Zielantigen des jeweiligen scFv-Fc ein Oberflächenprotein und kein Oberflächenglykolipid darstellte.

Auch hier wurde zur Auswertung die Gatingstrategie für Histogramme angewendet (2.6.4.2), wobei zur Kontrolle ein nicht transfizierter Überstand (NT) plus gamFitc diente. Der Versuch wurde insgesamt zwei Mal wiederholt.

2.10.3 Internalisierung

Um das Potential einer zielgerichteten Anreicherung im Zytoplasma der Zellen durch Endozytose der scFv-Fc charakterisieren zu können, wurde ein Internalisierungsversuch im konventionellen FACS durchgeführt. Es wurden je Ansatz 2×10^5 Zellen der Zelllinie Kasumi-1 benötigt. Diese wurden zunächst bei 500 g für 5 Min. in WP-FACS gewaschen, ehe sie für 10 Min. bei RT via 10 % AB-Serum geblockt wurden.

Daraufhin erfolgte eine erneute Waschung bei 500 g und 4 °C für 5 Min., ehe sie in 100 µl der scFv-Fc 11, 22, 24 und 35 aufgenommen und bei 4 °C für 30 Min. inkubiert wurden.

Nach diesem Schritt wurde das Experiment in vier Arme aufgeteilt, die sich durch die zeitliche Abfolge der weiteren Färbeschritte unterschieden.

Arm 1 wurde direkt in WP-FACS gewaschen und mit einer 1 : 50 gamFitc-Verdünnung in WP-FACS weitergefärbt (siehe unten). Arm 2 bis 4 wurden jedoch zunächst in 37 °C warmem RPMI + 20 % FBS aufgenommen und bei 37 °C zur weiteren Inkubation gelagert, so dass eine Endozytose ermöglicht werden könnte, sofern die scFv-Fc internalisierbar wären (Hermey 2010).

Diese Inkubation wurde in unterschiedlichen Zeitabständen von 15 Min., 1 h und 4 h gestoppt, indem die Zellen in WP-FACS überführt und für 5 Min. bei 500 g und 4 °C zentrifugiert wurden.

Nachfolgend schloss sich in Analogie zum ersten Arm eine Färbung mit je 100 µl der 1 : 50 gamFitc-Verdünnung an. Die Inkubation wurde für weitere 30 Min. bei 4 °C durchgeführt. Nach erneuter Waschung in 1 ml WP-FACS bei 500 g und 4 °C für 5 Min. erfolgte die FACS-Messung.

Auch hier wurde die Auswertung mithilfe von Histogrammen (2.6.4.2) vorgenommen, wobei als Kontrolle ein nicht transfizierter Überstand plus gamFitc diente. Es wurden insgesamt drei Wiederholungen der Internalisierungen mit den AK 11, 22, 24 und 35 durchgeführt, wobei jeweils in Dubletten gemessen wurde.

2.11 Analyse der scFv-Fc in der Konfokalmikroskopie

Die Konfokalmikroskopie stellt eine besondere Art der Lichtmikroskopie dar. Durch Steuern der beleuchteten Ebene des Präparates kann mit ihr ein gezieltes Anregen einzelner Fluorochrome eines entsprechend gefärbten Präparates erreicht werden. Durch separates Scannen aller weiteren Ebenen mit nachfolgender Rekonstruktion wird so ein Raumeindruck des Präparates mit hoher Auflösung erzielt (Hermey 2010).

In vorliegender Arbeit wurde das Konfokalmikroskop LSM-800 der Carl Zeiss AG verwendet. Dieses war ein Laser-Scanning-Mikroskop, welches somit durch einen Laser die jeweils eingestellte Ebene des Präparates punktwise abtastete. Dadurch konnte einfallende Streustrahlung aus weiteren Ebenen desselben Präparates stark reduziert werden, welches das hohe Auflösungsvermögen dieser Methodik erklärte (Hermey 2010).

2.11.1 Internalisierung in Kasumi-1

Zur Untersuchung der Internalisierung der scFv-Fc der AK 11, 22, 24 und 35 wurden zunächst dieselben Färbeschritte wie zur Internalisierungsmessung im Durchflusszytometer (2.10.3) ausgeführt. Für die Konfokalmikroskopie wurde sich jedoch auf die Darstellung von Arm 1 (0 h) und Arm 4 (4h) beschränkt.

Nach der unter 2.10.3 bereits beschriebenen letzten Waschung in WP-FACS für 5 Min. bei 500 g und 4 °C wurde das Pellet in 1 % PFA (1 % Paraformaldehyd in PBS) resuspendiert und in eine Cytofunnel™ eingebracht. Diese wurde nachfolgend in der Cytozentrifuge bei 700 rpm für 5 Min. zentrifugiert. Das Eindecken dieser so hergestellten Cytospins erfolgte wie unter 2.6.10 beschrieben.

2.11.2 Bindung auf AML-Primärzellen

Neben der Internalisierung wurde auch die reine Oberflächenbindung auf den Patientenblasten im Konfokalmikroskop dargestellt. Hierfür wurden für jedes herzustellende Cytospin-Präparat 250.000 Zellen gefärbt.

Zur Herstellung der Vergleichbarkeit zu den Messungen der Blastencharakteristika in der spektralen Durchflusszytometrie wurde dieselbe Färbung wie unter 2.12.1 beschrieben bis einschließlich zur Zugabe 1 : 50 gamFitc-Verdünnung mit nachfolgender WP-FACS-Waschung durchgeführt. Nach dieser gamFitc-Färbung wurden die gefärbten Zellen durch Zugabe von 1 % PFA fixiert und via Cytofunnels™ plus Cytozentrifuge gemäß 2.11.1 weiterverarbeitet.

2.12 Analyse der scFv-Fc in der spektralen Durchflusszytometrie

Zwecks höherer Sensitivität wurde zur Bindungscharakterisierung der scFv-Fc bzgl. primären Patienten- und Spenderzellen auf das spektrale Durchflusszytometer (2.6.5) zurückgegriffen. Da insbesondere der Fitc-Messwert interessiert, weil dieser die scFv-Fc detektierte, wurde die FMO-Kontrolle (2.6.5.1) entsprechend angepasst.

2.12.1 Charakterisierung der AML-Primärzellen

Nach Auftauen der kryokonservierten Patientenblasten (siehe 2.6.3) und ggf. Entfernung von toten Zellen via Dichtegradientenzentrifugation (siehe 2.6.1) wurde zur Charakterisierung der Bindungseigenschaften der hergestellten scFv-Fc pro Färbung je 1×10^6 Patientenzellen eingesetzt.

Die Zellen wurden einmal mit WP-FACS gewaschen und für 5 Min. bei 2.400 rpm abzentrifugiert, ehe sie für 10 Min. mittels 10 %-igem AB-Serum bei RT geblockt wurden. Nach erneutem Waschen bei 2.400 rpm für 5 Min. wurden sie mit 100 µl scFv-Fc-haltigen HEK-Überstand versetzt und für 30 Min. bei 4 °C inkubiert. Es erfolgte anschließend eine zweimalige Waschung in WP-FACS bei 2.400 rpm für je 5 Min.

Da der HEK-Überstand unkonjugierte, d.h. nicht mit einem Fluorochrom gekoppelte scFv-Fc enthielt, musste nachfolgend ein mit Fitc-konjugierter Sekundärantikörper (gamFitc) hinzugegeben werden. Hierfür ist eine Verdünnung von gamFitc 1 : 50 in WP-

FACS angesetzt worden, welche nach Zugabe zu den Zellen für 30 Min. bei 4 °C inkubiert wurde.

Es erfolgte anschließend eine zweimalige Waschung (2.400 rpm, 5 Min. mit WP-FACS) sowie ein zusätzlicher Block mit 10 %-igem Mäuseserum für 10 Min. bei RT im Dunkeln. Nach erneutem einmaligem Waschen wurde schließlich ein Gemisch aus diversen AK zur weiteren Subtypisierung der Populationen hinzugegeben. Auch hier erfolgte eine Inkubation für 20 Min. bei RT im Dunkeln mit nachfolgender einmaliger Waschung.

Kurz vor der Messung wurde zudem eine Verdünnung von 1 : 10 Sytox™ in WP-FACS zu den Zellen gegeben. Sytox™ fungierte hier als DNA-Interkalator und ermöglichte somit die Exklusion toter Zellen.

Als Kontrolle fand wie unter 2.6.5.1 bereits beschrieben eine auf gamFitc ausgerichtete FMO-Kontrolle Anwendung. Zudem wurde zum Ausschluss des Einflusses der zellulären Autofluoreszenz je eine ungefärbte, native Probe mitgemessen. Für alle gefärbten Proben wurden je 300.000 Zellen zur Auswertung aufgenommen.

2.12.1.1 Gatingstrategie

Die Gatingstrategie für Blasten im spektralen Durchflusszytometer wurde wie im konventionellen Durchflusszytometer (siehe 2.6.4) auf Basis des FSC-SSC-Gates begonnen, welches eine Beschränkung auf die Gesamtpopulation ohne Zelltrümmer erlaubte.

Anzumerken ist, dass aus Gründen der Vergleichbarkeit FSC und SSC in allen spektralen Diagrammen stets linear, Fluoreszenzmesswerte hingegen immer in logarithmischen Skalen aufgetragen wurden.

Um nachfolgend Dubletten, d.h. Zellen, die nicht einzeln, sondern gemeinsam beim Durchgang durch den Laserstrahl erfasst wurden und damit falsch hohe Signale generiert hatten, auszugaten, wurde FSC_H (FSC_Height) gegen FSC_A (FSC_Area) aufgetragen (UWCCC Flow Cytometry Laboratory 2014). All diejenigen Zellen, die hierbei nicht linear und damit proportional bzgl. dieser beiden Größen waren, wurden als Dubletten definiert und blieben daher für weitere Auswertungen unberücksichtigt (siehe Abbildung 15).

Daraufhin wurde mit dem Plot SSC_A gegen Sytox™ weitergearbeitet. Wie oben bereits erwähnt, färbt der Interkalator Sytox™ lediglich tote Zellen an, weshalb jene Zellen, die in diesem Plot ein Fluoreszenzsignal abgaben, nicht weiterverfolgt wurden.

Die verbliebenen lebenden Zellen wurden für weitere Auswertungen anhand der Marker CD45 und CD34 in distinkte Subgruppen unterteilt. Hierdurch konnten die Blasten (Phänotyp: CD45dimCD34+, siehe Abbildung 15) identifiziert werden. Der Phänotyp CD45+CD34- charakterisierte indessen alle nicht blastären Zellen.

Ein Auftragen der derart definierten Populationen gegen gamFit, welches den interessierenden scFv-Fc färbte, ermöglichte die finale Auswertung (siehe 3.11.1).

2.12.1.2 Auswertungskriterien

Die Auswertung erfolgte anhand desselben Kriteriums A wie bei den Analysen der scFv-Fc in der konventionellen Durchflusszytometrie (siehe 2.10.1.1) bzw. der Einzelphagenanalysen (siehe 2.7.4.1). Aufgrund der höheren Sensitivität des spektralen Durchflusszytometers für Fluoreszenzen wurde auf das Kriterium B verzichtet.

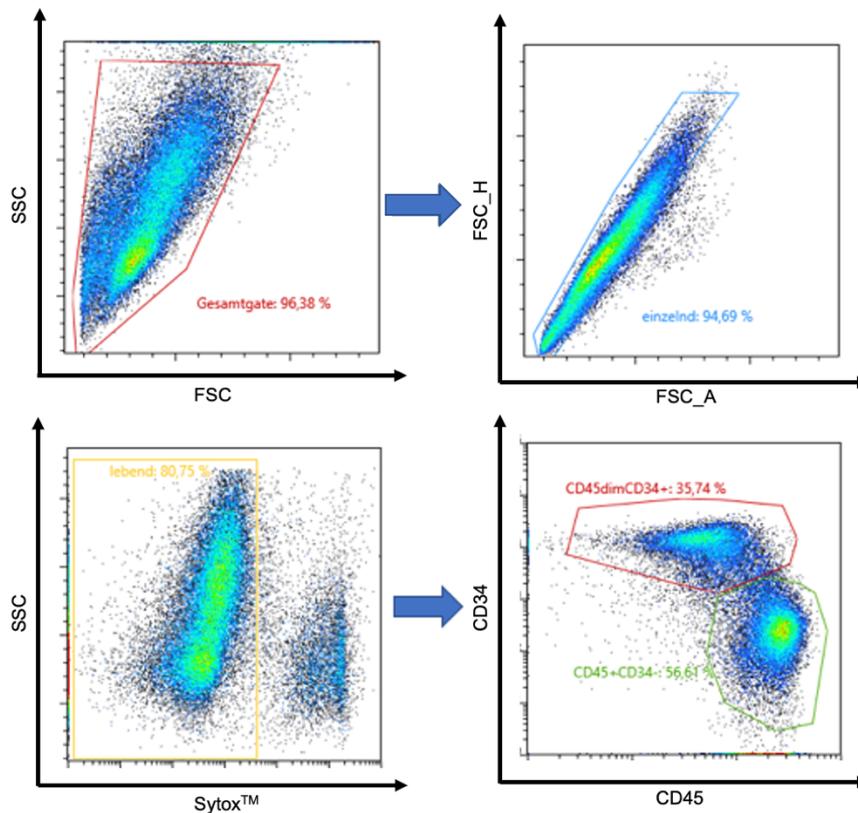


Abbildung 15: Spektrale Durchflusszytometrie - Gatingstrategie Blasten

Exemplarisch abgebildet ist die Gatingstrategie der Blasten des Patienten B. Hierbei wurden zunächst alle Zellen mithilfe eines Gesamtgates (links oben) geortet. Im nächsten Plot oben rechts wurden Dubletten ausgegated. Dubletten sind Zellen, welche während des Messvorgangs den FACS-Laser gemeinsam durchschreiten, so dass zwei Zellen als ein Messsignal i.S. einer einzigen Zelle gewertet werden. Da sie sich bezüglich ihrer erfassten Größe und dem gemessenen Signal jedoch nicht wie eine einzelne Zelle verhalten, können sie erkannt und exkludiert werden. Hierfür trägt man FSC_Area(A) gegen FSC_Height(H) auf und gatel alle Zellen aus, welche sich bezüglich dieser beiden Größen nicht proportional verhalten (UWCCC Flow Cytometry Laboratory 2014) (Schafferus 2012).

Nachfolgend (untere Reihe) wurden die lebenden Zellen der nun erhaltenen „Singulett“ identifiziert, indem alle Zellen ausgewählt wurden, die für Sytox negativ waren und damit lebten (gelbe Umrandung). Der daraus resultierende finale Auswertungsplot war das Diagramm CD34 gegen CD45. Die Blasten wurden hierbei an ihrer Expression des Vorstufenmarkers CD34 und der geringen (diminished, syn. dim) Expression des ausgereiften Zellmarkers CD45 erkannt (Phänotyp: CD45dimCD34+). Alle ausgereiften Zellen waren indessen negativ für CD34 und stark positiv für CD45 (Phänotyp: CD45+CD34-) (Leach et al. 2013).

2.12.2 Charakterisierung gesunder Blutspenderzellen

Zur Charakterisierung von gesunden Blutzellen wurde freiwilligen Spendern am Vortag oder am Tag der Messung Blut in EDTA-Monovetten® entnommen. Zum Erhalt der Leukozyten wurde daraufhin eine Erythrozytenlyse (siehe 2.6.8) durchgeführt. Alle weiteren Färbeschritte verliefen analog zu denjenigen der Patientenblasten (vgl. 2.12.1). Auch bei diesen Messungen wurden je 300.000 Zellen pro Probe charakterisiert und eine gamFitc-FMO-Kontrolle sowie eine native Kontrolle mitgeführt (vgl. 2.12.1).

2.12.2.1 Gatingstrategie

Die Gatingstrategie der gesunden Blutspenderzellen ähnelte derjenigen für Blasten im spektralen Durchflusszytometer (vgl. 2.12.1.1). Auch hier wurde zunächst auf die Gesamtpopulation an Zellen im FSC-SSC-Plot gegatet, ehe FSC_A gegen FSC_H zur Dublettenentfernung näher betrachtet wurde. Nachfolgend wurden alle toten, d.h. Sytox™-positive Zellen exkludiert und die verbliebenen Zellen im Plot SSC gegen CD45 weiter differenziert.

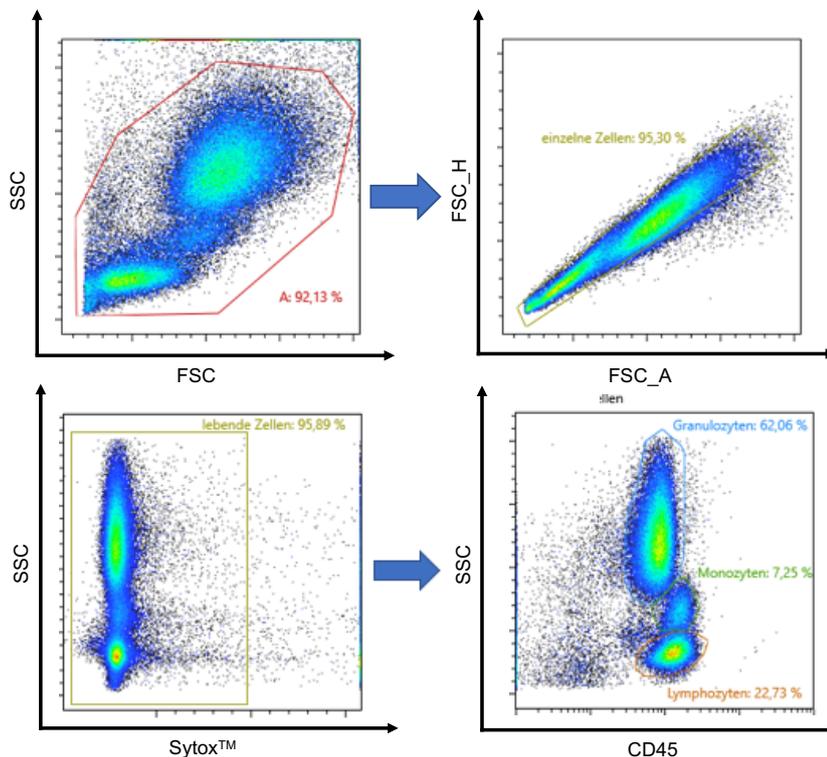


Abbildung 16: Spektrale Durchflusszytometrie - Gatingstrategie gesunder Blutspenderzellen

Aufgrund der Ähnlichkeit der vorliegenden Strategie gegenüber derjenigen für Blasten wird für weitere Informationen bzgl. der drei ersten Diagramme auf die Gatingstrategie für Blasten (siehe Abbildung 15) verwiesen. Nachfolgend wird allein das finale Diagramm CD45 gegen SSC beschrieben.

Aufgetragen sind in diesem Plot die Skalen der gefärbten Marker CD45 gegen den Granularitätsmarker SSC. Hierdurch wird eine Unterscheidung der drei größten Blutpopulationen ersichtlich: Granulozyten (hoher SSC), Monozyten (mittlerer SSC) und Lymphozyten (geringster SSC aufgrund geringster Granularität). Alle diese Zellen tragen den Phänotyp CD45+.

Hierbei wurde die differierende Granularität der Zellen ausgenutzt, so dass die Populationen der Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten, wie in Abbildung 16 gezeigt, abgrenzbar wurden. Ein Auftragen der abgegrenzten Populationen gegen gamFitc ermöglichte letztlich die Auswertung (siehe 3.11.2).

2.12.2.2 Auswertungskriterien

Die Auswertungskriterien für die gesunden Blutspenderzellen entsprachen denjenigen für Blasten (siehe 2.12.1.2).

Ergebnisse

3.1 Literaturrecherche und Aufstellung der PD-Strategien

Anhand der durchgeführten Literaturrecherche (vgl. 2.1) bezüglich der Selektion auf ganzen Zellen wurden sieben Artikel näher analysiert und schließlich zwei zentrale Schlussfolgerungen für vorliegende Arbeit abgeleitet.

Erstens war die Technik der Depletion des Phage Displays eine in den Quellen stets vernachlässigte Stellgröße. So wurde entweder gar nicht depletiert (vgl. (Galili et al. 2008) (Karjalainen et al. 2011) (Mohseni Nodehi et al. 2012) (Jäger et al. 2007)) oder eine Depletion mit via Buffy-Coat respektive Ficoll-Hypaque gewonnenen Zellen / Zellfragmenten durchgeführt.

Die Problematik bei den über Dichtegradientenzentrifugation gewonnenen Zellen wurde darin gesehen, dass nicht alle Zellpopulationen des peripheren Blutes enthalten blieben. So wurden durch den Ficoll-Hypaque insbesondere Granulozyten exkludiert, was eine Reduktion der möglichen Depletionsantigene (DA) darstellte (siehe 2.6.1).

Da trotz Ficoll-Hypaque jedoch spezifische Ergebnisse in der Literatur gewonnen werden konnten (z.B. (Fitting 2012)), wurden aus Gründen der Nachvollziehbarkeit und Vergleichbarkeit mit den Literaturangaben zwei Experimentierarme mit einer Dichtegradientenzentrifugation via Ficoll-Hypaque als Depletionsstrategie aufgestellt.

Die Buffy-Coats (z.B. (Geuijen et al. 2005)) wurden demgegenüber positiver bewertet, weil in diesen über Zentrifugation gewonnenen Leukozytenkonzentraten alle Populationen des peripheren Blutes enthalten blieben.

Da im Zuge dieser Arbeit jedoch ein Großteil der Auswertungen mittels Durchflusszytometer durchgeführt wurde, wurde sich für die dem Buffy-Coat äquivalente Methode der Erythrozytenlyse entschieden. Denn auch mit ihr bleiben alle Populationen des peripheren Blutes erhalten. Zusätzlich findet sie jedoch routinemäßigen Einsatz innerhalb der FACS-Labore der hiesigen Schwesteruniversitätsklinik. Eine etwaige Verwendung in deren Routinelaboren hätte so aufgrund der gleichen Methodik zur Befreiung von roten Blutkörperchen vereinfacht werden können. Daher wurden zwei weitere Experimentierarme mit Erythrozytenlyse etabliert.

Zudem war laborintern postuliert worden, dass Monozyten - ggf. befähigt durch ihre Fc-Rezeptoren - scFv-Fc unspezifisch abfangen könnten und damit ggf. falsch-positive Ergebnisse liefern würden. Dieser Problemstellung wurde ein weiterer Experimentierarm gewidmet, indem neben der Erythrozytenlyse eine Monozyten-Adhärenzanreicherung für eine Doppeldepletion durchgeführt wurde.

Durch diese Variationen innerhalb der Depletion wurde sich ein Effekt auf die Spezifität der späteren scFv versprochen, da die Vielfalt an Depletionsantigenen und damit das

Abfangen unspezifischer scFv je nach angewandter Depletionsstrategie stetig stieg (siehe Abbildung 13). Es wurde zudem darauf geachtet, pro Depletionsstrategie jeweils drei verschiedene, dem AML-Patienten geschlechtsidentische Blutspender auszuwählen, um die Verschiedenartigkeit der DA weiter zu erhöhen.

Zweitens war in den recherchierten Publikationen die Strategie der Selektion auf ganzen Zellen sehr heterogen gewählt worden. So unterschieden sich die Publikationen u.a. in ihren Anzahlen an durchgeführten Runden pro Selektionsstrategie, die zwischen zwei und fünf schwankten. Außerdem wurde entweder auf reinen Zelllinien selektioniert (vgl. (Fitting et al. 2015) (Jäger et al. 2007) (Karjalainen et al. 2011)) oder zusätzlich auf angereicherten Proteinen (vgl. (Mohseni Nodehi et al. 2012)), ferner aber auch auf AML-Primärzellen nach bereits durchgeführter erster Selektionsrunde auf einer Zelllinie (vgl. (Bakker et al. 2004) (Geuijen et al. 2005)). Auch an dieser Stelle konnte eine starke Varianz beobachtet werden, da entweder eine einzige Zelllinie verwendet wurde oder aber mehrere Zelllinien vor Selektion miteinander vermischt wurden.

Auf reinen Primärzellen wurde lediglich in der Publikation von Galili *et al.* (Galili et al. 2008) selektioniert, wobei Galili *et al.* (Galili et al. 2008) CML-Zellen in der finalen Blastenkrise verwendet hatte und daher auf hochprozentige Blastenzahlen des jeweiligen Patienten angewiesen war. Um diese Abhängigkeit von prozentualen Anteilen an Blasten zu eliminieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit nach einer Möglichkeit der Aufreinigung von Blasten gesucht.

Da viele AML-Zellen den Stammzellmarker CD34 exprimierten, wurde sich letztlich für eine Aufreinigung mit CD34-MACS-Beads entschieden, wodurch zur Selektion hochreine CD34+ Blasten verwendet werden konnten.

Dieses Prozedere der Blastenanreicherung war in Jäger *et al.* (Jäger et al. 2007) zur Testung der selektionierten Binder beschrieben und kam in hiesiger Arbeit nun während der Selektion zur Anwendung.

Die hierfür notwendig gegebene Voraussetzung war eine Positivität für den Blastenmarker CD34, welche somit das bestimmende Auswahlkriterium zur Aufnahme der Patientenblasten in das Probenklientel der PD-Strategiearme darstellte.

Diese CD34-Aufreinigung wurde für alle Patienten mindestens ein Mal durchgeführt - mit Ausnahme von den Patienten D und 0 (siehe hierzu 3.2).

In Zusammenschau dieser Überlegungen mit vorhandenen Proben- und Patientencharakteristika, u.a. abgeleitet aus den prozentualen Blastenanteilen (siehe 3.2), wurden daher insgesamt fünf PD-Strategien etabliert, welche zur Übersicht in Abbildung 13 angeführt sind.

3.2 Bestimmung des prozentualen Anteils an Blasten

Wie unter 2.6.6 beschrieben, wurde der Anteil an Blasten mittels Gatingstrategie durch Bestimmung der CD34-Positivität der Blasten festgelegt. Hierbei sind die in Tabelle 13 gelisteten prozentualen Anteile der Blasten an der Gesamtpopulation von Patientenzellen nach Dichtegradientenzentrifugation ermittelt worden.

Patient	Anteil an Blasten [%]
0	52
A	26
B	34
C	76
D	96

Tabelle 13: Prozentualer Anteil an Blasten

Dargestellt sind die jeweiligen Patienten mit ihren Blastenanteilen angegeben in Prozent [%] der Gesamtpopulation an Zellen nach Dichtegradientenzentrifugation.

Die hieraus resultierenden Blastenanteile sind in die durch Literaturrecherche abgeleiteten PD-Strategien eingeflossen, indem sie die Notwendigkeit einer Aufreinigung zur Selektion bedingt durch zu geringe Blastenanteile abbildeten (vgl. Abbildung 13).

Bei Patient D wurde auf einen CD34-MACS verzichtet, da der Blastenanteil bereits weit über 90 % betrug und dies eine Aufreinigung unnötig werden ließ. Patient 0 wurde indessen nativ belassen, um einen späteren Vergleich des Outcomes zwischen den Experimentierarmen durchführen zu können.

Patient C war mit 76 % Blastenanteil als grenzwertig geeignet zur nativen Verwendung anzusehen. Es wurde daher entschieden, ressourcensparend zu arbeiten und nur die erste Selektionsrunde mit CD34-Anreicherung, alle nachfolgenden Runden dieses Patienten jedoch in nativem Zustand der Zellen ohne vorherige Anreicherung durchzuführen (vgl. Abbildung 13).

3.3 Anreicherungen von Blasten nach immunmagnetischer Separation

Zur Selektion der Patientenblasten wurden die Patienten A, B und C nach CD34 aufgereinigt und ausgewertet (siehe 2.6.7). Hierbei konnten mittlere Anreicherungen zwischen 95 % und 99 % erzielt werden.

Patient C wurde, wie unter 3.2 beschrieben, nur in der ersten Selektionsrunde aufgereinigt, Patienten A und B für jede der drei SR.

3.4 Anreicherungen von Monozyten über Adhärenz

Für die Doppeldepletion des Patienten D wurde eine Adhärenzanreicherung von Monozyten (vgl. 2.6.9) und nachfolgend eine FACS-Messung bzgl. des Monozytenmarkers CD14 durchgeführt, um deren prozentualen Anteil am angereicherten Zellmaterial zu bestimmen. Der Mittelwert der Anreicherung betrug dabei 68 % (Spannweite 54 % - 78 %).

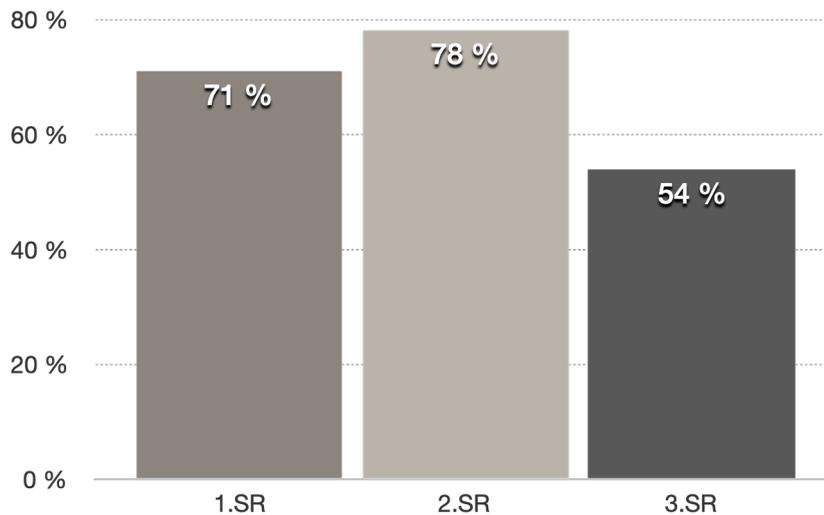


Abbildung 17: Prozentuale Anreicherung an Monozyten

Das Säulendiagramm zeigt die prozentualen Adhärenzanreicherungserfolge der Monozyten pro Selektionsrunde (1. – 3. SR abgebildet) für die PD-Strategie des Patienten D.

3.5 Phage Display

3.5.1 Output- / Input-Titer

Nach den jeweils 1. bis 3. SR wurden pro Strategie sowohl der Phagen-Input- als auch der Phagen-Output-Titer bestimmt.

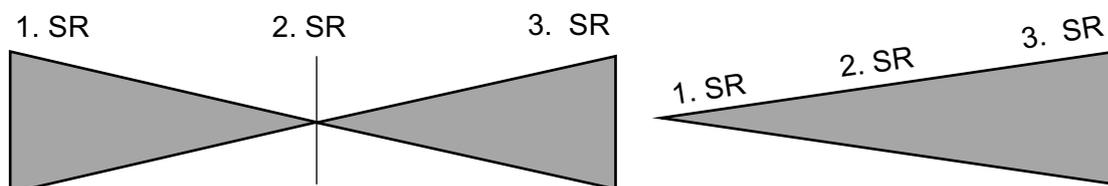


Abbildung 18: Formen des Output- / Input-Titers

Der Phagen-Output- / Phagen-Input-Titer gibt Auskunft über das Verhältnis der nach der Selektionsrunde resultierenden Phagen zu den initial eingesetzten Phagen je Selektionsrunde.

Zwei Formen des Output- / Input-Titers wurden bei vorliegender Arbeit erkannt: Zum einen wurde eine Sanduhrform ersichtlich, welche für alle Patienten - außer Patient D - Gültigkeit besaß. Zum anderen hatte Patient D eine Rampenform mit stetigem Anstieg der Output-Titer und damit des Output- / Input-Verhältnisses.

Hierbei spielte insbesondere das Verhältnis von Output zu Input eine große Rolle, da durch die Bildung dieses Quotienten die Varianz in der Produktion der Phagen pro Runde nicht länger ins Gewicht fiel und so eine wahre Zu- bzw. Abnahme an Phagen je Selektionsrunde ersichtlich werden konnte.

Generell ließen sich zwei Formen unterscheiden (siehe Abbildung 18). So wurde für Patient D von der 1. bis zur 3. SR ein stetiger Anstieg des Output- / Input-Titers beobachtet (Rampenform). Für alle anderen Patienten wurde jedoch eine Abnahme von der 1. zur 2., allerdings ein Anstieg von der 2. zur 3. SR gesehen, welches somit einer Sanduhr glich. Für die expliziten Zahlenwerte wird auf den Anhang unter 6.4 verwiesen.

3.5.2 Phagenbindung auf AML-Primärzellen gemäß polyklonaler Analyse

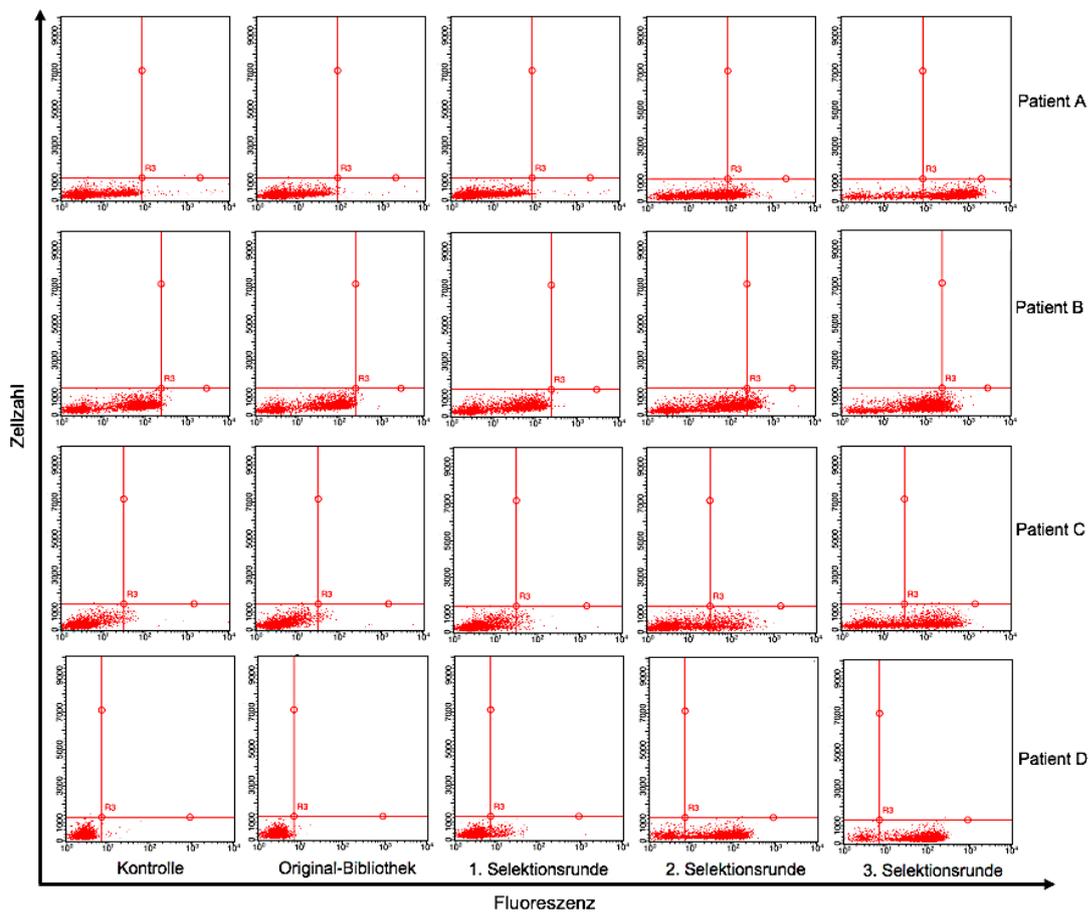


Abbildung 19: Polyklonale Analyse der Patienten A, B, C und D

Zu sehen ist die Auswertung der polyklonalen Analysen der Patienten A, B, C und D in Form von Dot Plots. Die polyklonale Analyse diente dazu, einen Anreicherungsprozess der Phagen vor weiteren Bearbeitungsschritten zu zeigen. Hierfür wurde ein Anstieg der Fluoreszenz und damit Bindungsstärke der Phagen mit steigender Selektionsrunde erwartet.

Bei den hier abgebildeten Patienten lässt sich dies im Vergleich zur unselektionierten Original-Bibliothek nachvollziehen, da im Verlauf der 1. – 3. Selektionsrunde immer mehr Zellen in den positiven Bereich rechts der Vertikalen übertreten. Als Kontrolle diente eine Färbung ohne Phagen, d.h. [anti-M13 + gamFitc]. Auf der Ordinate sind dabei Zellzahlen, auf der Abszisse Fluoreszenzsignale angegeben.

Die Auswertung der polyklonalen Analyse (2.7.2) gemäß der unter 2.7.2.2 beschriebenen Kriterien ergab ein Anreicherungs­erfolg für alle getesteten Patienten mit Ausnahme des Patienten 0.

Abbildung 19 zeigt die FACS-Auswertung der Patienten A, B, C und D. Die polyklonale Analyse des Patienten 0 findet sich im Anhang unter 6.5.1. Patient 0 erfüllte hierbei das Kriterium nicht, gemäß dem mindestens 10 % der Zellen hätten positiv sein müssen. Daher wurde dieser Arm nicht mehr weiterverfolgt. Alle anderen PD-Arme wurden in der monoklonalen Analyse weitergetestet.

Eine tabellarische Ergänzung der oben gezeigten Dot Plots ist im Anhang (6.5.2) dargestellt.

3.5.3 Phagenbindung auf AML-Primärzellen und Blutspenderzellen gemäß monoklonaler Analyse

Da die polyklonale Analyse von Patient 0 keine Anreicherung ergeben hatte, wurden monoklonale Analysen gemäß den Angaben unter 2.7.3 nur von den Patienten A, B, C und D durchgeführt (siehe Abbildung 20).

Für jeden der vier Patienten wurden je 352 Proben getestet und anhand der unter 2.7.3.2 benannten Kriterien patientenintern verglichen und zur Sequenzierung ausgewählt. Insgesamt wurden so 1408 einzelne Proben analysiert.

Sequenziert wurden schließlich insgesamt 53 der 1408 Proben (Patient A: 8, Patient B: 25, Patient C und D: je 10). Hierbei wurden patientenindividuelle Phagen gefunden.

Für jeden Patienten separat betrachtet, ergaben sich daher eine patienteneigene Phagensequenz für Patient A, drei für Patient B, vier individuelle Sequenzen für Patient C sowie keine einzige patientenindividuelle Sequenz für Patient D.

Es ist anzumerken, dass vier Sequenzen des Patienten C nach dreimalig gescheiterter Sequenzierung final nicht ausgewertet werden konnten und in der Sequenz unbekannt blieben.

Besonders hervorzuheben ist, dass zwischen den einzelnen Patienten auch sequenzgleiche Phagen (sog. Konsensus-Phagen) selektioniert wurden und zwar jeweils ein Phage zwischen Patient A und B, Patient B und C sowie zwischen Patient A und D, welches in Abbildung 20 durch die Benutzung eckiger Klammern dargestellt wird. Gleichfalls wurden zwei Phagen, welche aus Vorversuchen für diese Arbeit bekannt und auch auf AML-Primärzellen selektioniert worden waren, zu den hiesigen Phagen als sequenzgleich identifiziert. Beide dieser Phagen waren mit vorhandenem Ambercodon und damit in nativer Konfiguration selektioniert worden.

Unter Berücksichtigung dieser Konsensus-Phagen wurden somit insgesamt 11 verschiedene Sequenzen, d.h. 11 verschiedene Phagen, erhalten. Diese Sequenzen

wurden nach ihrer Startnummer in der Reihenfolge ihrer Sequenzierung bezeichnet. Die Bezeichnung wurde im Verlauf auch zur Betitelung der AK (d.h. der scFv-Fc) beibehalten. Jene waren 9, 11, 14, 18, 19, 22, 24, 33, 35, 44, 48.

Aus den Sequenzen wurde zusätzlich ersichtlich, dass die Phagen 14, 22 und 44 dieselben schweren Ketten besaßen, ebenso wie die Phagen 24 und 35 (siehe Tabelle 14). Dies wurde in der späteren Mutagenese (3.6) ausgenutzt, da die zu mutierenden CDR2-Regionen in der schweren Kette zu finden und somit innerhalb dieser scFv-Inserts sequenzgleich waren.

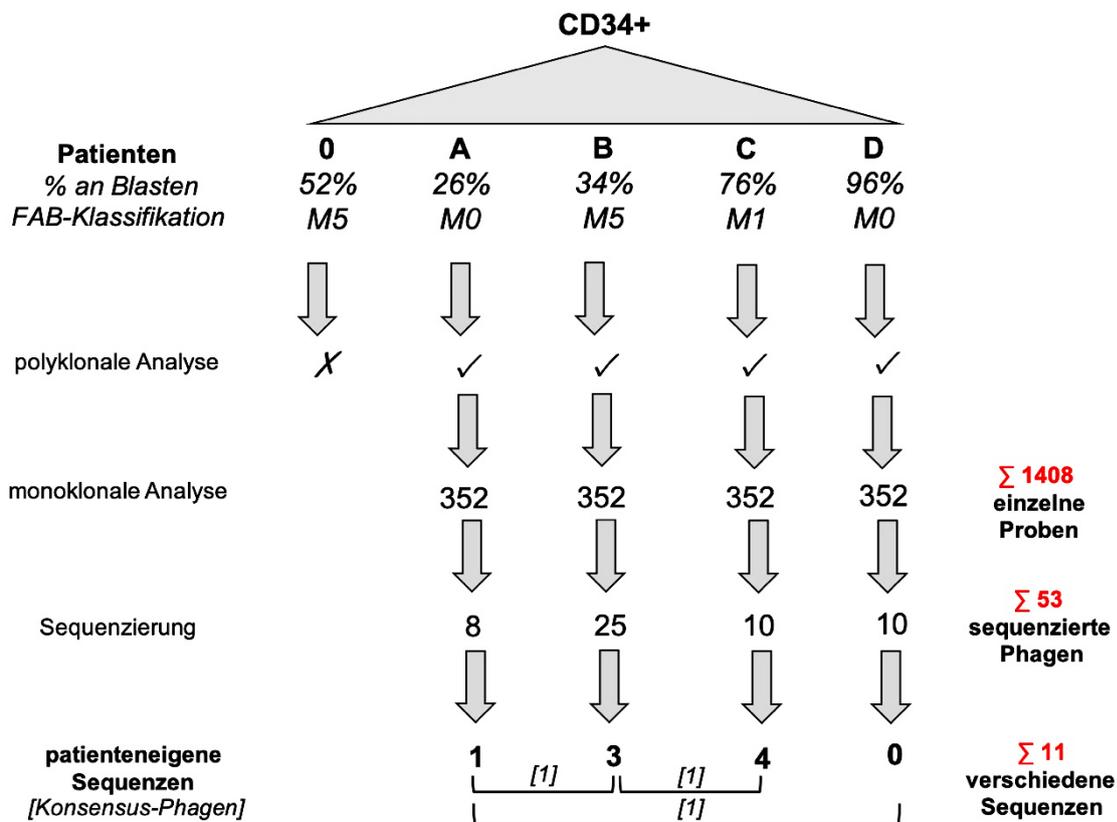


Abbildung 20: PD-Schemata mit nachfolgenden Analysen

Dargestellt sind alle PD-Schemata und deren weitere Verfolgung in poly- und monoklonalen Analysen inklusive der schlussendlich erhaltenen unterschiedlichen Sequenzen. - Hierbei wurde Patient 0 aufgrund der mangelnden Anreicherung, gezeigt in der polyklonalen Analyse unter 3.5.2, nicht weiter analysiert (X). Alle anderen Patienten erfüllten die Bedingungen der Passage der polyklonale Analyse hin zur monoklonalen Analyse (✓). Insgesamt (Σ) wurden letztlich 1408 einzelne Proben weiter analysiert, die 53 Sequenzierungen nach sich zogen, welche ihrerseits wiederum final 11 verschiedene Sequenzen zeigten (nähere Erläuterungen siehe Fließtext).

Besonders erwähnenswert sind hierbei sequenzgleiche Phagen (Konsensus-Phagen), welche jeweils zwischen den Patienten A und B, Patienten B und C sowie den Patienten A und D beobachtet wurden.

Als patienteneigene Sequenzen bzw. Phagen werden wiederum all jene Phagen bezeichnet, die nur in der jeweiligen Selektion innerhalb eines Patienten auftauchten, nicht aber gleichfalls in einer Selektion eines anderen Patienten gefunden wurden. Patienteneigene Phagen sind somit individuelle Phagen spezifisch für den jeweiligen Patienten.

3.5.4 Phagenbindung auf AML-Primärzellen und Blutspenderzellen gemäß Einzelphagenanalyse

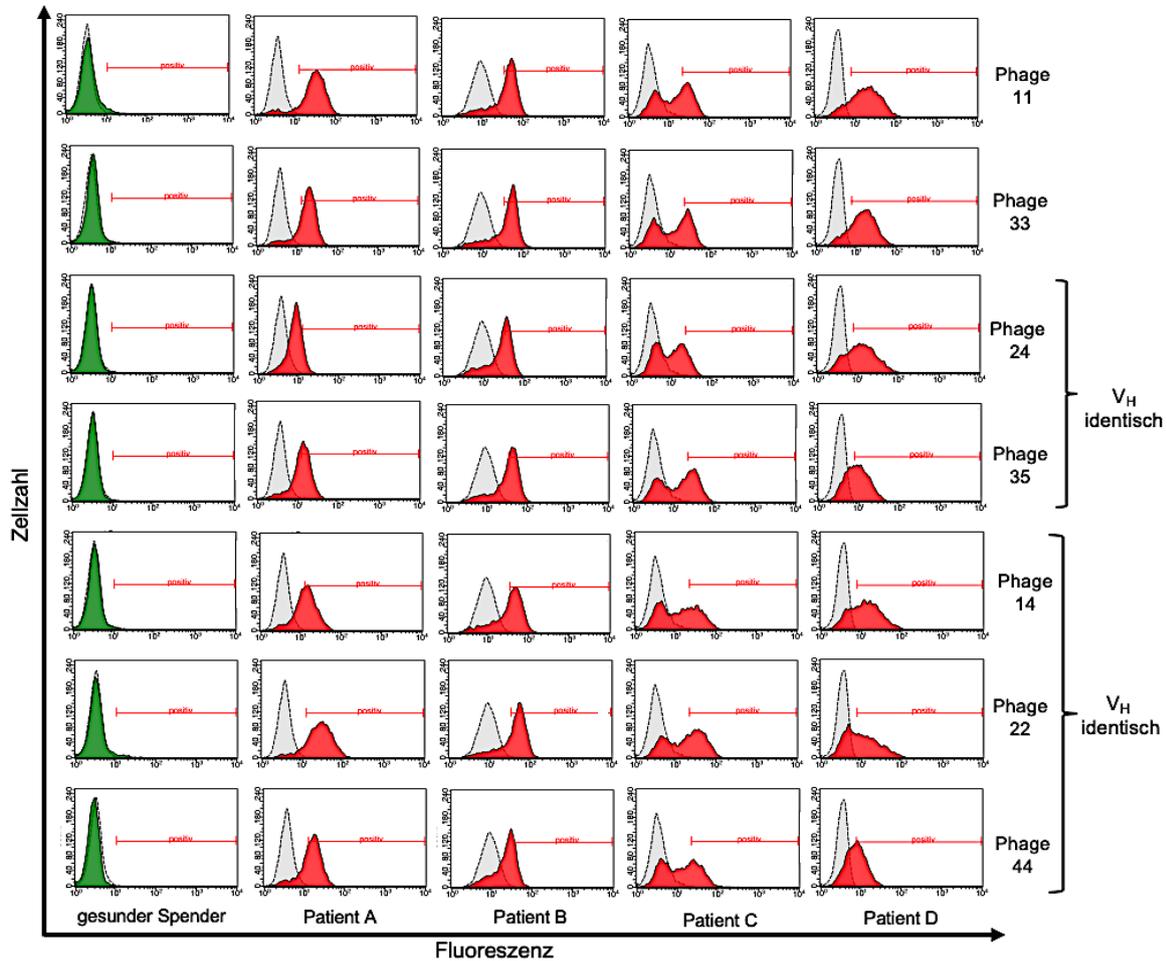


Abbildung 21: Einzelphagenanalyse

Dargestellt sind FACS-Histogramme der Patienten A, B, C und D nach Färbung mit den sieben selektionierten Phagen. Auf der Y-Achse ist die Zellzahl, auf der X-Achse der gemessene Fluoreszenzwert abgebildet. Grau im Hintergrund findet sich die jeweilige Kontrolle anti-M13 + gamFitc. - Die Färbungen mit den selektionierten Phagen wurden als Overlay (Blasten in Rot, Blutspenderzellen in Grün) eingepflegt. Das positive Gate wird definiert durch den roten Balken rechts in den Histogrammen. - Zu beachten ist die fast deckungsgleiche Überlagerung der gefärbten gesunden Blutspenderzellen mit der Kontrolle. Dies impliziert eine Negativität der Phagen für den gesunden Blutspender, indessen alle Patientenzellen erkannt und gebunden werden, welches einen Shift der Zellen nach rechts in das positive Gate generiert. - Rechts neben den Histogrammdarstellungen sind in geschweiften Klammern jeweils die Phagen mit gemeinsamen schweren AK-Ketten (V_H) angegeben. Abkürzungen: V_H – variable Region der schweren Kette;

Alle 11 Sequenzen, die sich in der monoklonalen Analyse als verschieden gezeigt hatten, wurden nachfolgend erneut als Einzelphagen getestet (2.7.4). Hierbei konnte die in der monoklonalen Analyse weggefallene Titerbestimmung erfolgen, wodurch sich validere Aussagen zum Bindungsverhalten der einzelnen Phagen treffen ließen.

Die Einzelphagen wurden anhand der unter 2.7.4.1 dargestellten Kriterien bewertet. Von den so hergestellten Einzelphagen erwiesen sich sieben als vielversprechend, da

negativ auf den mitgetesteten gesunden Blutspenderzellen, jedoch positiv für alle getesteten Patientenzellen (vgl. Abbildung 21). Diese waren 11, 14, 22, 24, 33, 35, 44. Auch die Zelllinie Kasumi-1 wurde mitgetestet und erwies sich als positiv für alle sieben o.g. selektionierten Phagen (siehe Anhang 6.6.1). Vier Phagen zeigten sich wiederum reaktiv für gesunde Spenderzellen, weshalb diese nicht weiterverfolgt wurden. Dies waren die Phagen 9, 18, 19 und 48. Hierunter fielen auch jene zwei Phagen, die aus den Vorversuchen bekannt waren. Eine tabellarische Übersicht zur Gesamtbindung der Einzelphagen passend zur Abbildung 21 findet sich im Anhang unter 6.6.2.

3.5.5 Zuordnung der aussichtsreichsten sieben Phagen zur PD-Strategie

Die Zuordnung der sieben in obiger Einzelphagenanalyse (siehe Abbildung 21) dargestellten Phagen zu ihrem jeweiligen Patienten inkl. der verwendeten PD-Strategie ist zur vereinfachten Rückverfolgung in Abbildung 22 dargestellt.

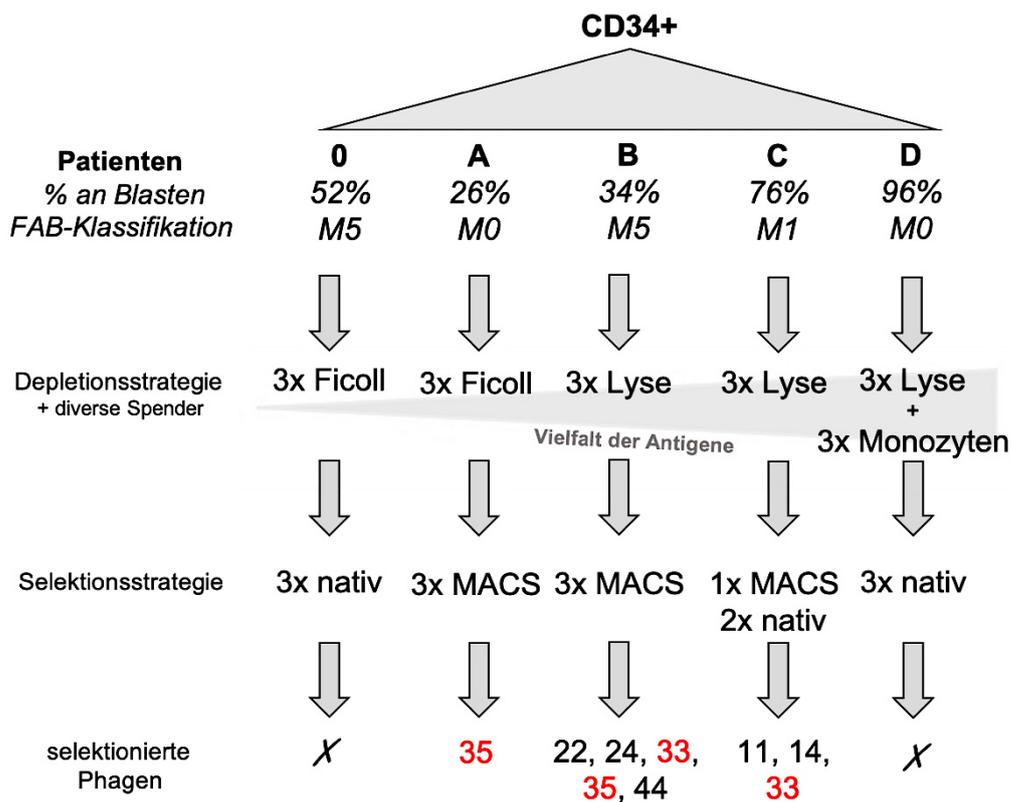


Abbildung 22: Zuordnung der selektionierten Phagen zur verwendeten PD-Strategie

Dargestellt sind die jeweiligen Patienten mit gewählten PD-Strategien und den daraufhin separat selektionierten Phagen. Rot geschrieben sind dabei jene der sieben vielversprechendsten Phagen, welche bei zwei Patienten parallel selektioniert wurden (Konsensus-Phagen 35 und 33). Patient 0 und D – d.h. die Selektionen mit den geringsten und den höchsten Depletionsantigenen – ergaben keine vielversprechenden Phagen (X). – Für weitere Erörterungen bezüglich der Schemata und Abkürzungen sei auf Abbildung 13 verwiesen.

Patient 0 und D zeigten keine Anreicherung von anhand der unter 2.7.4.1 genannten Kriterien als vielversprechend postulierten Phagen. Patient A hingegen zeigte einen vielversprechenden Phagen (entspricht dem Konsensus-Phagen mit Patient B), Patient B fünf (hierunter der bereits erwähnte Konsensus-Phage mit Patient A sowie ein weiterer Konsensus-Phage mit Patient C) und Patient C drei vielversprechende Phagen (hierunter besagter Konsensus-Phage mit Patient B). In Summe sind daher sieben Phagen als aussichtsreich zu betiteln.

Zusammenfassend war somit zu beobachten, dass die Depletionsstrategien mit der geringsten Antigenvielfalt sowie jene mit der höchsten Antigenfülle die geringste Ausbeute an AML-spezifischen Phagen einbrachten.

3.6 Mutagenese

Nr.	V _H			V _L		
	CDR 1	CDR 2	CDR 3	CDR 1	CDR 2	CDR 3
11	GFTFSSYA	I Q HLSGRT	AKHATSFDY	QSISSY	RAS	QQWAIVPPT
14					RAS	QQAHTAPST
22		I Q GRGHRT	AKSSLVFDY		YAS	QQSSLTPAT
44					AAS	QQSYSTPNT
24					RAS	QQYQTGPMT
35		IT Q RGSST	AKGTTVFDY			QQNALAPMT
33		IQN R G Q ST	AKSAARFDY		NAS	QQPHTSPFT

Tabelle 14: Sequenzen der CDR

Dargestellt sind die Sequenzen aller CDR der selektionierten vielversprechenden sieben scFv-Inserts. Zu sehen ist die vom Hersteller der Tomlinson J vorgegebene Sequenzgleichheit der CDR1 sowohl der schweren als auch der leichten Kette. Die Diversifikation betrifft somit die CDR2 und CDR3 beider Ketten. Die CDR2 der schweren Kette V_H trug dabei ein Ambercodon, welcher durch ortsspezifische Mutagenese eliminiert und durch die Aminosäure Glutamin (Q) ersetzt werden konnte. Abkürzungen: V_H- variable Region der schweren Kette; V_L – variable Region der leichten Kette; mutierte Aminosäure – rot dargestellt;

Wie anhand der Sequenzierung offenkundig wurde, hatten alle sieben der vielversprechenden Phagen in der CDR2-Region der schweren Kette (V_H) ein Ambercodon, welcher somit in Non-Suppressorstämmen bzw. Eukaryoten nicht als korrektes Protein exprimiert worden wäre (vgl. 1.3.3.1). Daher wurde die Mutagenese

mithilfe des jeweils spezifisch designten Mutagenese-Primers, wie unter 2.8.5 dargelegt, durchgeführt. Alle sieben Inserts konnten so erfolgreich mutiert werden (vgl. Tabelle 14). Diese Sequenzen wurden wie unter 2.8.4 beschrieben mittels Sanger-Sequenzierung auf die Richtigkeit ihrer sie codierenden DNA-Basenabfolgen überprüft. Zudem wurden für die Sequenzen der internalisierende scFv-Fc (siehe 3.9.3) zusätzlich eine massenspektrometrische Analyse durchgeführt (vgl. 6.13).

Zur Einsicht der vollständigen DNA-Basenabfolgen der korrekt mutierten Inserts sei an dieser Stelle auf den Anhang unter 6.7 verwiesen.

3.7 Klonierung in den pMS2-Vektor und Transfektion in HEK293T-Zellen

Die Klonierung in den pMS2-Vektor mit nachfolgender Hitzeschocktransformation der XL1-Blue zur Herstellung scFv-Insert tragenden Vektoren erfolgte gemäß den Angaben unter 2.8.9. Der korrekte Einbau des Inserts in den Vektor pMS2 wurde hierbei sowohl mittels hausinterner als auch externer Sequenzierung überprüft (siehe 2.8.4), ehe die Transfektion in die eukaryotische Zelllinie HEK293T erfolgte.

Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurden an Tag 3 die bereits erfolgreich transfizierten und damit GFP exprimierenden Zellen via FACS bestimmt. Hierbei lag der prozentuale Anteil der Plasmid tragenden HEK293T zwischen 26 % und 80 %. Daraufhin wurde ein Selektionsdruck via Zeocin appliziert, um diesen Anteil zu steigern.

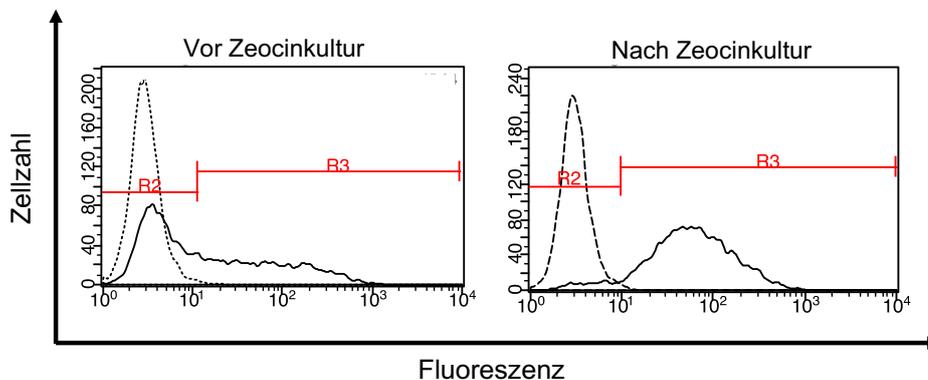


Abbildung 23: Zeocinselektionsdruck HEK293T-Zellen

Dargestellt ist der Einfluss des Zeocinselektionsdrucks auf die Anreicherung der erfolgreich transfizierten HEK293T-Zellen mit dem scFv-Insert und GFP tragenden pMS2-Vektor. Die Kontrolle, bestehend aus nicht transfizierten HEK293T-Zellen, ist dabei als gestrichelte Linie im Hintergrund zu sehen. Die durchgezogene schwarze Linie ist der GFP-Messwert; links: vor Zeocinselektionsdruck an Tag 3 nach Transfektion, rechts: nach dreiwöchiger Zeocinkultur. Für den abgebildeten AK 11 betrug die Transfektionseffizienz 46 % der Zellen vor und 93 % der Zellen nach Zeocinkultur. In den abgebildeten Diagrammen trägt die Abszisse das Fluoreszenzsignal, die Ordinate die Zellzahl.

Nach derartiger dreiwöchiger Kultur konnte eine finale Effizienz zwischen 89 % und 96 % erzielt werden, ehe die Zellen zur scFv-Fc-Produktion weiterkultiviert wurden.

Exemplarisch ist in Abbildung 23 die Transfektionseffizienz des AK 11 an Tag 3 und nachfolgend deren Steigerung durch dreiwöchige Zeocinkultur dargestellt.

3.8 Nachweis der hergestellten scFv-Fc

Der Nachweis der produzierten scFv-Fc im HEK293T-Überstand wurde zum einen durch eine SDS-PAGE mit anschließendem Westernblot geführt (siehe Abbildung 24). Hierfür wurden drei separate Gele angefertigt, wobei die erwarteten Molekulargewichte unter reduzierenden und denaturierenden Bedingungen bei etwa 59 kDa lagen (vgl. 2.9.1.1), da anstatt der scFv-Fc-Homodimere (vgl. 1.2.2) Einzelketten nachgewiesen wurden (Moutel et al. 2009).

Innerhalb aller drei Gele mit nachfolgendem Membranblotting konnten die einzelnen scFv-Fc-Ketten erfolgreich nachgewiesen werden. Exemplarisch ist in Abbildung 24 eine der Membranen mit erfolgreichem Nachweis abgebildet.

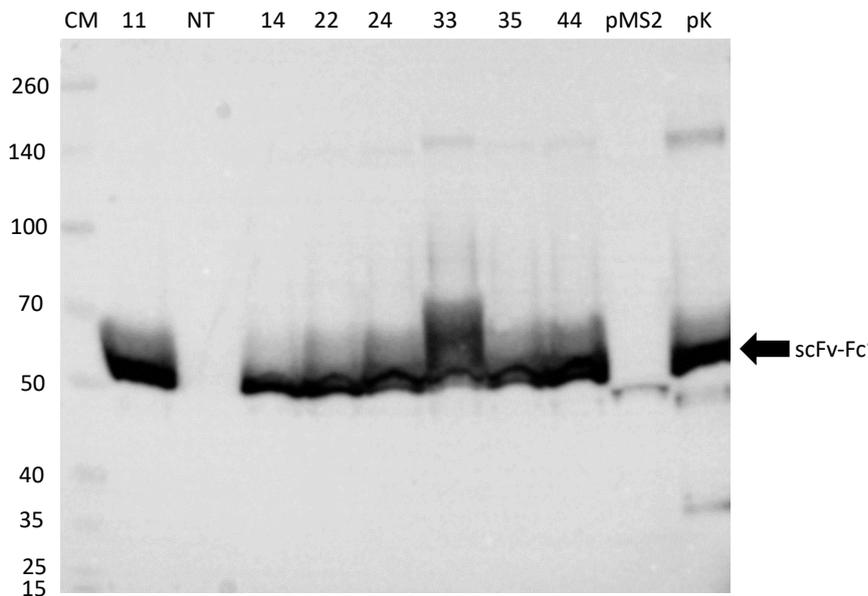


Abbildung 24: Westernblot-Nachweis der scFv-Fc

Dargestellt ist eine der drei Westernblotmembranen zum Nachweis der scFv-Fc-Monomere unter reduzierenden und denaturierenden Bedingungen. Als Positivkontrolle (pK) diente ein im Labor bereits hergestellter und in früheren Projekten validierter scFv-Fc. Als Negativkontrolle wurde nicht transfizierter Überstand von HEK293T-Zellen verwendet (NT). - Der leere Vektor (pMS2), welcher nur einen Stuffer (= DNA-Platzhalter für ein zu klonierendes DNA-Fragment (Sauermost und Freudig 1999b)) in die Klonierungsstelle eingebracht besaß, wurde als Größenkontrolle mitgeführt, ebenso wie ein Größenmarker für Westernblots (CM). Die Skala links zeigt den Marker mit Molekulargewichtsangaben in Kilodalton (kDa).

Zum anderen wurden für die AK 11, 22, 24 und 35 nach NiNTA-Aufreinigung und Coomassie-Färbung mit anschließender massenspektrometrischer Analyse zusätzlich direkt die Aminosäuresequenzen nachgewiesen. Weitere Ausführungen zu diesen Techniken inklusive deren Auswertungen sind im Anhang unter 6.9 bis 6.13 zu finden.

Ebenso sind dort die vollständigen Aminosäuresequenzen aller scFv-Fc zusammengetragen (siehe 6.8).

3.9 Analyse der scFv-Fc in der konventionellen Durchflusszytometrie

3.9.1 Überprüfung von Kreuzreaktivitäten

Um die Eigenschaften der scFv-Fc besser darstellen zu können, wurden sie zunächst gemäß den Angaben unter 2.10.1 auf acht verschiedenen Zelllinien getestet.

AK	11			14			22			24			33			35			44		
Kriterien	MFI	10%	Σ																		
Kasumi-1 (M2)	++	++	+	+++	+++	+	++	++	+	++	++	+	-	+	-	+	++	+	-	+	-
Kasumi-3 (M0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HCC-44	-	-	-	++	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DMS-273	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KM-H2	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nalm-6	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RD-ES	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HEK293T	-	-	-	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Kriterium A (MFI)		Kriterium B (10%)		Σ = positiv: Beide Kriterien mit mind. + erfüllt
MFI-Anstieg unter 75 %:	-	Unter 10 % der Zellen:	-	
MFI-Anstieg um mind. 75 %:	+	Mind. 10 % der Zellen:	+	
MFI-Anstieg um mind. 100 %:	++	Mind. 50 % der Zellen:	++	
MFI-Anstieg um mind. 150 %:	+++	Mind. 75 % der Zellen:	+++	

Tabelle 15: Auswertung der FACS-Kreuzreaktivitäten auf diversen Zelllinien

Abgebildet ist die tabellarische Übersicht zur Auswertung der Überprüfung von Kreuzreaktivitäten auf diversen Zelllinien. Beide unten abgebildeten Kriterien A und B mussten mindestens mit „+“ erfüllt sein, um auf einer Zelllinie als positiv zu gelten. Die Zelllinie Kasumi-1 wurde dabei von allen AK – bis auf AK 33 und 44, welche an dem Kriterium A scheiterten und daher aus weiteren Versuchen exkludiert wurden – erkannt. Alle AK erwiesen sich außer AK 14 als negativ für alle getesteten Zelllinien, wobei darunter noch eine weitere AML-Zelllinie fiel (Kasumi-3).

Abkürzungen: MFI – Kriterium A bezogen auf MFI (median fluorescence intensity), 10 % - Kriterium B bezogen auf den Mindestprozentanteil (mind.) an positiven Zellen; Σ - Summe aus Kriterium A und B, nur als positiv (+) gewertet, wenn beide Kriterien erfüllt wurden; „+“ – positiv; „-“ – negativ; mind. – mindestens; Zelllinien: Kasumi-1 – AML M2; Kasumi-3 – AML M0; HCC-44 – nicht kleinzelliges Bronchialkarzinom; DMS-273 – kleinzelliges Bronchialkarzinom; KM-H2 – Hodgkin-Lymphom; Nalm-6 – Akute lymphatische Leukämie des B-Zell-Typs; RD-ES – Ewing-Sarkom; HEK293T – Humane embryonale Nierenzellen;

Die Auswertung anhand der unter 2.10.1.1 dargestellten Kriterien ergab, dass die AK 11, 14, 22, 24 und 35 die Zelllinie Kasumi-1 erkannten. AK 33 und 44 wurden jedoch als negativ auf den Kasumi-1-Zellen klassifiziert, da sie das Kriterium A, d.h. der Mindestanstieg der MFI, nicht erfüllten.

Alle Antikörper - bis auf AK 14, welcher positiv für die Zelllinie eines nicht kleinzelligen Bronchialkarzinoms (HCC-44) und für humane embryonale Nierenzellen (HEK293T) zeichnete - erkannten die restlichen sieben mitgetesteten Zelllinien hingegen nicht.

Sechs von diesen Zelllinien waren keine AML-Zelllinien, darunter eine akute lymphatische Leukämie (Nalm-6). Die siebente war jedoch eine weitere AML-Zelllinie (Kasumi-3). Interessanterweise wurde Kasumi-3 somit von allen getesteten AK nicht als AML-Zelllinie erkannt (vgl. Tabelle 15).

Durch diese Testung konnte eine weitere Eingrenzung der AK durchgeführt werden. So wurden die AK 33 und 44 in der Weiterverfolgung fallengelassen, da sie die für funktionelle Versuche verwendete Zelllinie Kasumi-1 nicht gebunden hatten und daher ungeeignet bzgl. weiterer Charakterisierungen auf Kasumi-1-Zellen waren.

AK 14 wurde gleichfalls nicht weiterverfolgt, da er als einziger AK auch andere Zelllinien außer AML-Zelllinien erkannte. In Folgeversuchen wurde daher allein mit den AK 11, 22, 24 und 35 weitergearbeitet.

3.9.2 Trypsinierung

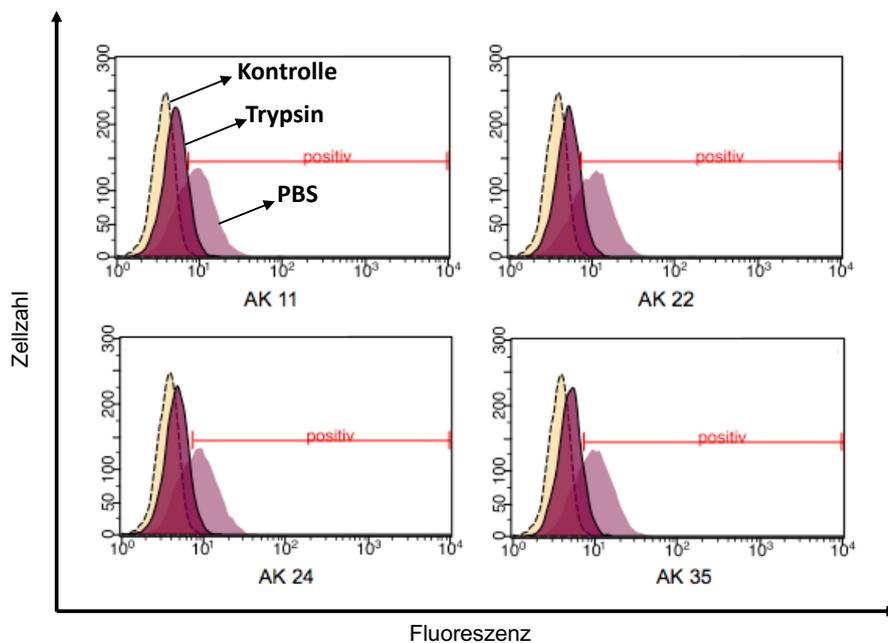


Abbildung 25: Trypsinierung der AK 11, 22, 24 und 35

Dargestellt sind auf der X-Achse die Fluoreszenzwerte und auf der Y-Achse die Zellzahlen, wobei Histogramme als Abbildungsform gewählt wurden. Im Hintergrund ist die ungefärbte Kontrolle der Kasumi-1-Zellen in Hellgelb dargestellt (Kontrolle), anhand derer das positive Gate des roten Balkens gesetzt wurde. Die Messwerte der PBS-Inkubation sind die fliederfarbenen Messwerte ohne Umrandung (PBS), indessen der trypsinierete Messwert jener auberginefarbene mit durchgezogener Umrandung ist (Trypsin), der beinahe den Wert der Kontrolle erreicht. Eine exemplarische Beschriftung ist im Histogramm des AK 11 abgebildet. Somit konnte für alle AK ein verminderter Fluoreszenzmesswert nach Inkubation mit Trypsin im Vergleich zu PBS-inkubierten Zellen beobachtet werden.

Die Trypsinierung mit Kasumi-1-Zellen, wie unter 2.10.2 ausgeführt, sollte das potentielle Antigen weiter eingrenzen und zeigen, ob das Antigen des jeweiligen AK ein Glykolipid oder ein Membranprotein ist. Letzteres würde über Trypsin verdaut und damit mit

längerer Inkubationsdauer in trypsinhaltigem Medium immer schwächer auf der Oberfläche via AK detektierbar werden, so die Prämisse.

Wie in Abbildung 25 ersichtlich ist, konnten verminderte Fluoreszenzwerte nach Inkubation mit Trypsin (hier nach 30 Min. dargestellt) im Vergleich zur PBS-Inkubation (gleichfalls 30 Min.) für alle getesteten AK (11, 22, 24 und 35) nachgewiesen werden.

Auch innerhalb der verschiedenen Zeitpunkte des Abstoppens der Trypsinierung konnte ein Gradient des Rückgangs der Fluoreszenzen beobachtet werden, welches im Anhang unter 6.14 einzusehen ist. Somit ist von einem membranständigen, trypsinresistenten Peptid als Zielantigen aller vier getesteten AK auszugehen.

3.9.3 Internalisierung

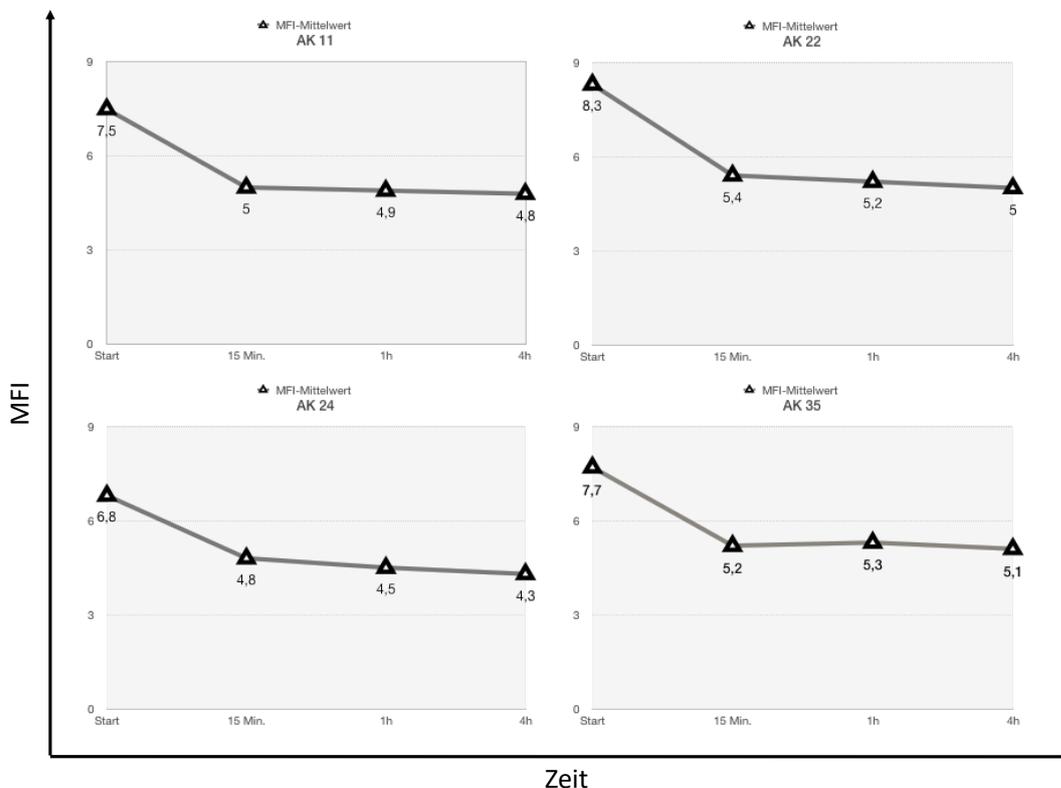


Abbildung 26: Internalisierung im konventionellen FACS

Aufgetragen sind die MFIs auf der Ordinate gegen die Zeit auf der Abszisse. Die Zeitachse zeigt dabei Messwerte von Beginn der Messung (Start), 15 Min. später, 1 h später sowie 4 h nach Messbeginn, welches somit die Gesamtdauer der Inkubation bei 37 °C beschreibt, ehe der Messwert generiert wurde. Für den eingetragenen Messwert des Graphen wurde hierbei der Mittelwert aller MFIs aus allen drei Versuchen, in Doppelwerten gemessen, gebildet. - Bei allen AK ist letztlich ein Rückgang der Fluoreszenzen über die Zeit zu verzeichnen, wobei AK 22 die stärkste Abnahme um 40 % zur Ursprungsfluoreszenz besitzt.

Für die potentielle Eignung der selektionierten AK als AK-Wirkstoff-Konjugat wäre der Nachweis der antigenvermittelten Endozytose der scFv-Fc als Bedingung zum targetierten Transport des zytotoxischen Wirkstoffes notwendige Voraussetzung (Harper

et al. 2013). Die Testung der Internalisierung wurde daher wie unter 2.10.3 beschrieben mit Kasumi-1-Zellen ausgeführt. Es wurden drei Wiederholungen pro getestetem AK angesetzt und jeweils in Doppelwerten gemessen. Die Mittelwerte der Mediane (MFI) aller drei Versuche wurden daraufhin aus insgesamt sechs Messwerten bestimmt. Sie sind in Abbildung 26 als Graphen abgebildet.

Es wird ersichtlich, dass alle AK eine Verminderung der Fluoreszenzen im Verlauf der Inkubationen zeigten. Die stärkste Abnahme wurde bei AK 22 um 40 % des Ursprungsmesswertes verzeichnet. Bei AK 24 wurde die minimalste Signalverminderung mit 34 % beobachtet. Somit ist von einer Internalisierung der AK auszugehen. Den Fluoreszenzwert der Kontrolle von 3,4 erreichte nach 4 h Inkubation keiner der getesteten AK (siehe 2.10.3).

3.10 Analyse der scFv-Fc in der Konfokalmikroskopie

3.10.1 Internalisierung in Kasumi-1

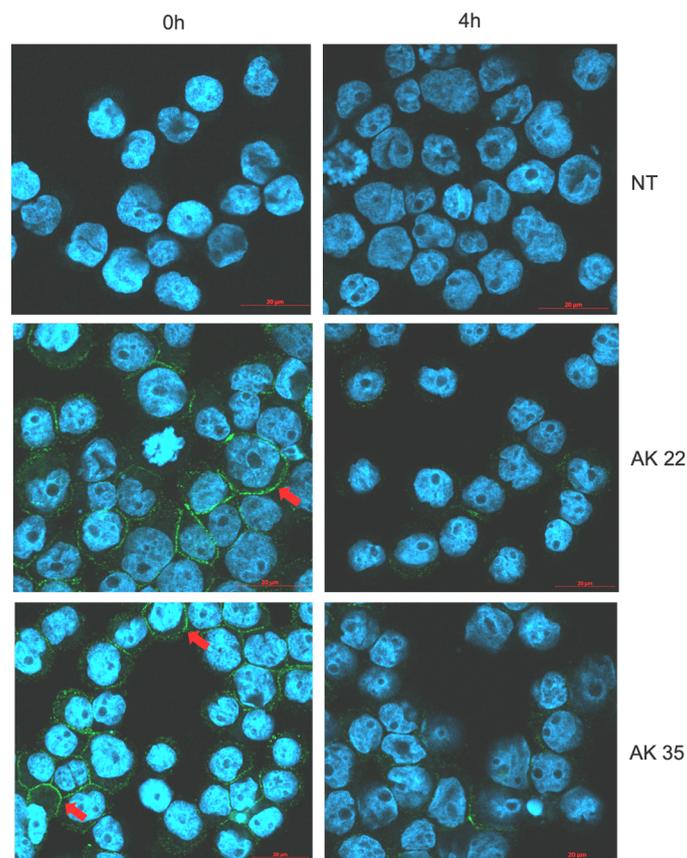


Abbildung 27: Konfokalmikroskopie der Internalisierung von AK 22 und 35

Dargestellt sind die Internalisierungsansätze der AK 22 und 35 nach 4-stündiger Inkubation bei 37 °C, wobei die linke Spalte den 0 h-Wert zu Beginn der Internalisierung und die rechte Spalte den 4 h-Wert nach Internalisierung zeigen. - Als Negativkontrolle diente eine Färbung mit nicht transfiziertem HEK-Überstand (NT), welcher äquivalent behandelt mitgefärbt wurde. - Zu sehen ist ein Verschwinden der grünen Fluoreszenz der Zellmembranen (rote Pfeile) im Vergleich zwischen dem 0 h- und dem 4 h-Wert. Die blaue Kernfärbung bestand aus DAPI (vgl. 2.11). Zur besseren Vergleichbarkeit mit den FACS-Messungen wurden auch für die konfokalmikroskopischen Bilder Kasumi-1-Zellen verwendet. Größenmarker: 20 µm;

Zur Vervollständigung der konventionellen FACS-Experimente zur Internalisierung wurde eine Visualisierung in der Konfokalmikroskopie (2.11) angestrebt.

Auch hier konnte eine verminderte Membranfärbung der Kasumi-1-Zellen nach 4 h Inkubation bei Körpertemperatur gesehen werden, welches in Abbildung 27 exemplarisch für die AK 22 und 35 dargestellt ist. Zur Einsicht der mikroskopischen Bilder der AK 11 und 24 sei auf den Anhang unter 6.15.1 verwiesen.

Als Resultat der Internalisierungsexperimente der Durchflusszytometrie sowie der vorliegenden konfokalmikroskopischen Bilder ist von einer Internalisierung der hergestellten scFv-Fc-Fusionsproteine AK 11, 22, 24 und 35 auszugehen.

3.10.2 Bindung auf AML-Primärzellen

Zum Nachweis einer Bindung der scFv-Fc außerhalb der Methode der Durchflusszytometrie wurden AML-Primärzellen mit den jeweils darauf selektionierten AK in der Konfokalmikroskopie getestet. Auch mit dieser Technik konnte ein Bindungsnachweis geführt werden.

Nachfolgend ist exemplarisch die Bindung des AK 11 an Patient C dargestellt. Alle weiteren konfokalmikroskopischen Nachweise sind zur weiteren Veranschaulichung im Anhang unter 6.15.2 abgebildet.

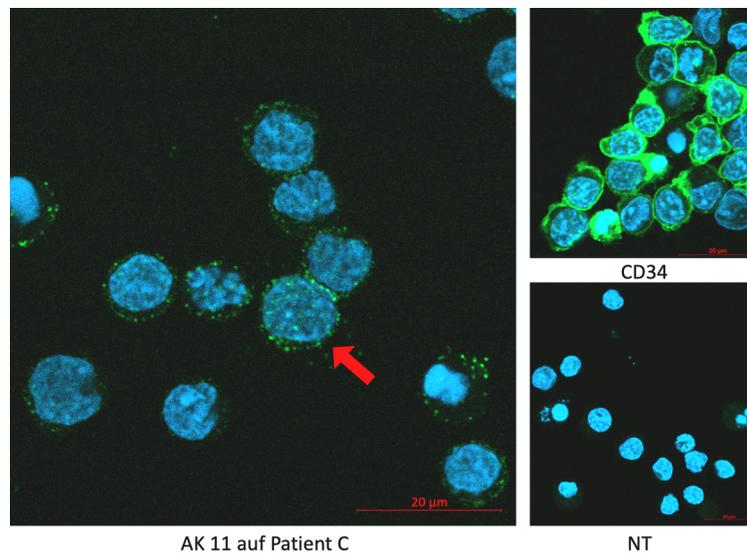


Abbildung 28: Konfokalmikroskopie des Patienten C

Dargestellt ist die Färbung des Patienten C mit dem auf ihm selektionierten AK 11. Wie links im Bild zu sehen, kann eine Anfärbung der Zellmembranen nachgewiesen werden (roter Pfeil). Als Positivkontrolle diente hierbei eine Färbung mit dem Blastenmarker CD34. Als Negativkontrolle wurde eine Färbung mit nicht transfiziertem HEK-Überstand (NT) durchgeführt. Größenmarker: 20 µm;

3.11 Analyse der scFv-Fc in der spektralen Durchflusszytometrie

3.11.1 Charakterisierung der AML-Primärzellen

Die Charakterisierung der scFv-Fc auf Primärzellen erfolgte wie in 2.12.1 beschrieben. Die Auswertungskriterien fußten auf den Fluoreszenzwerten des Kriteriums A (vgl. 2.7.4.1) und ergaben nachfolgend abgebildete Tabelle 16.

Es wurden stets CD34+ Primärzellen verwendet (siehe 4.4.2). Hierbei ließ sich die Tendenz erkennen, dass alle AK umso besser auf CD34+ Blasten gebunden hatten, je weiter deren Ausreifung (höhere FAB-Klassifikation) fortgeschritten war.

Sehr unreife M0-Blasten wurden nur schwach (AK 22 und 35) oder gar nicht (AK 11 und AK 24) erkannt, wobei die Blasten von Patient B (FAB M5) von allen AK sehr stark gebunden wurden, was auch für seine nicht blastäre Zellen galt. Auch wurden die nicht blastären Zellen von Patient C gebunden, hier jedoch nur durch den AK 24.

AK	11		22		24		35	
Kriterien	MFI	MFI*	MFI	MFI*	MFI	MFI*	MFI	MFI*
FAB M0 (Patient A)	-	-	+	-	-	-	+	-
FAB M0 (Patient D)	-	-	-	-	-	-	+	-
FAB M1 (Patient C)	+++	-	+++	-	+++	+	+++	-
FAB M2	+++	-	+++	-	+++	-	+++	-
FAB M3 / M4	n.d.							
FAB M5 (Patient B)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
FAB M6 / M7	n.d.							

Kriterium A

MFI-Anstieg unter 75 %:	-
MFI-Anstieg um mind. 75 %:	+
MFI-Anstieg um mind. 100 %:	++
MFI-Anstieg um mind. 150 %:	+++

MFI → Patientenblasten

MFI* → Nicht blastäre Zellen

n.d. → nicht durchgeführt

Tabelle 16: Auswertung AML-Primärblasten in der spektralen Durchflusszytometrie

Dargestellt ist die Auswertung der Patienten anhand des Fluoreszenzkriteriums A, tabellarisch gegliedert nach ihrer FAB-Klassifikation. MFI beschreibt dabei die median fluorescence intensity der CD34+ Blasten, indessen zur Vereinfachung alle nicht blastären, d.h. nicht CD34+ Zellen unter MFI* subsummiert sind. – AK 35 zeigte hierbei Reaktivität gegenüber allen Blasten der getesteten Patienten, wobei allerdings auch die nicht blastären Zellen, zumindest des Patienten B (FAB M5), erkannt wurden.

Patient B wurde von allen AK gebunden, wobei stets sowohl Blasten als auch nicht blastäre Zellen erkannt wurden. Der monozytäre Phänotyp der FAB M5 scheint somit ein Faktor für Bindungspositivität der AK zu sein. Für weitere Beschreibungen siehe Fließtext. Abkürzungen: n.d. – nicht durchgeführt; MFI – median fluorescence intensity der Blasten (CD34+); MFI* – median fluorescence intensity der nicht blastären Zellen (CD34-); „+“ – positiv; „-“ – negativ;

In der Positivität bzgl. Blasten ist AK 35 besonders hervorzuheben, der positiv für alle getesteten Blasten zeichnete. Allerdings war AK 35 nicht blastenspezifisch, da er nicht blastäre Zellen der FAB M5 (Patient B) erkannte.

3.11.2 Charakterisierung gesunder Blutspenderzellen

Die Charakterisierung und Auswertung der gesunden Blutspenderzellen erfolgte analog zu den AML-Primärzellen gemäß 2.12.2. Sie fußten daher gleichfalls allein auf dem Kriterium A.

Insgesamt wurden vier gesunde Spender zur Charakterisierung herangezogen, wobei die Blutgruppen A, B und 0 abgedeckt werden konnten. Zudem wurden sowohl weibliche als auch männliche Spender (jeweils zwei) charakterisiert, die überdies aus verschiedenen Altersdekaden stammten. Es wurde eine Altersspanne von 23 bis 56 Jahren abgedeckt. Eine tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse zeigt Tabelle 17.

AK	11			22			24			35		
Spender	G	M	L	G	M	L	G	M	L	G	M	L
56 J. ♂ BG A	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
48 J. ♀ BG A	-	++	-	-	+++	-	-	+++	-	-	++	-
30 J. ♂ BG B	-	+	-	-	++	-	-	++	-	-	++	-
23 J. ♀ BG 0	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-

Kriterium A			
MFI-Anstieg unter 75 %:	-		G → Granulozyten
MFI-Anstieg um mind. 75 %:	+		M → Monozyten
MFI-Anstieg um mind. 100 %:	++		L → Lymphozyten
MFI-Anstieg um mind. 150 %:	+++		

Tabelle 17: Charakterisierung gesunder Spenderzellen in der spektralen Durchflusszytometrie

Tabellarisch aufgeführt sind vier gesunde Spender jeweils aufgeschlüsselt in diverse Zellpopulationen ihres Blutes (Granulozyten (G), Monozyten (M), Lymphozyten (L)), welche mit vier der selektierten AK (11, 22, 24 und 35) gefärbt wurden. Daraufhin wurden sie anhand des Kriteriums A bzgl. ihres Fluoreszenzsignals für die diversen Zellpopulationen beurteilt. Abkürzungen: „+“ - positiv; „-“ - negativ; G – Granulozyten; M – Monozyten; L – Lymphozyten; J. – Jahre; BG A, B, 0 – Blutgruppe des Spenders A, B, 0; MFI – median fluorescence intensity; mind. – mindestens;

Wie aus der Tabelle ersichtlich wird, waren alle vier getesteten AK negativ für Granulozyten und Lymphozyten aller vier gesunden Blutspender. Einzig die Population der Monozyten wurde von allen AK bei wenigstens drei Spendern erkannt.

Die einzigen negativen Monozytenpopulationen waren die des 56-jährigen männlichen Spenders der Blutgruppe A bei den Testungen der AK 11 und 35. Da diese beiden AK aber auf allen anderen Spendern positiv für Monozyten zeichneten, sind auch diese AK als Monozyten bindend zu charakterisieren.

Außerdem war bei der Charakterisierung der gesunden Spender durch die selektierten AK zu beobachten, dass die Signalintensitäten der Antigenerkennungen

(d.h. MFI) zwischen den einzelnen positiven Monozyten z.T. stark variierten. Dies war unabhängig vom Geschlecht der Fall.

So wurden die Monozyten der weiblichen, 48-jährigen Spenderin der Blutgruppe A am besten von den AK erkannt. Die 23-jährige Spenderin der Blutgruppe 0 wurde jedoch nur sehr schwach gebunden. Diese Bindung erschien von ihrer Stärke her eher vergleichbar zu den niedrigen Messwerten des männlichen Spenders der Blutgruppe A. Ein zur Beurteilung dieses Phänomens wissenswerter Fakt ergab sich hierbei aus der Anamnese der beiden letzten Spender, es handelte sich um Vater und Tochter.

Diskussion

4.1 Zielsetzung

In Analogie zur Vision der Nobelpreisträger George P. Smith und Sir Gregory P. Winter, scFv-Bibliotheken zu entwerfen, deren Präsentation auf der Oberfläche von filamentösen Phagen zu ermöglichen und somit die Erforschung proteinaler Interaktionen voranzubringen, war das Ziel dieser Arbeit, die Oberflächeneigenschaften von AML-Blasten mithilfe des Phage Displays näher zu charakterisieren.

Hierzu sollte die Technik bzgl. der PD-Strategien auf ganzen Zellen optimiert und nachfolgend alle als vielversprechend befundene Antikörperfragmente durch Hinzufügen eines Fc-Fragmentes in lösliche Antikörperfusionsproteine (scFv-Fc) umgewandelt werden. Antikörperfragmente (z.B. scFv, Fab) bzw. -fusionsproteine (z.B. scFv-Fc) sind kleiner als komplette Antikörper (Z. Li et al. 2016) und können daher wirtschaftlicher produziert werden (Nelson 2010). Sie verfügen zudem über eine bessere Gewebegängigkeit (z.B. Tumorpenetration (X. Wang et al. 2011)), was ihnen bei therapeutischen und diagnostischen Anwendungen einen Vorteil gegenüber kompletten Antikörpern verschafft (Z. Li et al. 2016). Sie stellen daher eine prosperierende Alternative zu den klassischen monoklonalen Antikörpern dar (Holliger und Hudson 2005) (z.B. Abciximab, Certolizumab (Chames et al. 2009)).

Eine kurze Charakterisierung der derart selektierten scFv-Fc-Fusionsproteine sollte die Arbeit letztlich abrunden.

4.2 Optimierung der PD-Strategie

Zur Optimierung der PD-Strategien auf ganzen Zellen wurden die Ergebnisse der Literaturrecherche (3.1) herangezogen. Verbesserungspotential wurde insbesondere in den Bereichen der Depletion sowie der Selektion gesehen.

So sollte eine CD34-Immunseparation der Selektion einen höheren Blastenanteil verschaffen, um letztlich auf möglichst reinen Fraktionen an AML-Blasten selektieren zu können. Wenn möglich und durch geringe Blastenzahlen notwendig, wurden daher alle drei SR eines Patienten mit nach CD34 aufgereinigten Zellen durchgeführt. Eine Reduktion der AML-Zellzahlen im Verlauf der Selektionsrunden fand in vorliegender Dissertation keine Anwendung, da aufgrund der äußerst großzügigen Depletionsstrategien (s.u.) die Gefahr bestand, durch zusätzliche Reduktion der Zellzahlen schlussendlich keinen einzigen bindenden Phagen zu erhalten.

Zur Steuerung der Selektion wurden u.a. die Waschstringenz und die Phagenvalenz herangezogen (1.3.5). So stieg die Stringenz (d.h. die Härte der Waschungen) mit jeder SR durch Erhöhung der Anzahl an Waschungen und durch Hinzunahme des Detergens

Tween®20 stärker an. Die Anwesenheit von Tween®20 ermöglichte die Verminderung unspezifischer Phagenbindungen (Weissleder 2010), u.a. durch Reduktion des Einflusses unspezifischer hydrophober Wechselwirkungen auf den Phagenpool (Qiang et al. 2017).

Die Phagenvalenz nahm indessen mit steigender SR ab. Die noch in der ersten SR pentavalenten Phagen wurden durch Verwendung des Helferphagens M13K07 in den folgenden SR durch eine 10 %-ige Fraktion an monovalenten Phagen abgelöst (vgl. Abbildung 6). Beide Maßnahmen lenkten die Selektionsbedingungen im Verlauf der 1. - 3. SR letztlich derart, dass die Bindung der selektionierten Phagen mit steigender Rundenzahl immer stärker gefördert wurde.

Die in dieser Arbeit durchgeführten variantenreichen Depletionen dienten wiederum dem Abfangen unspezifischer Phagen mithilfe gesunder Blutspenderzellen, ehe man die Selektion auf AML-Zellen durchführte. Zur Abschätzung der besten Depletionsstrategie wurden daher steigende Antigenvielfalten durch Hinzunahme diverserer Zellpopulationen getestet. Insgesamt wurden somit fünf PD-Strategiearme etabliert (siehe Abbildung 13).

Die durchgeführten Selektionen, die durch eine CD34-MACS-bedingte Aufreinigung hin zu höheren Blastenzahlen beeinflusst wurden, können als erfolgreich angesehen werden. So betrug die Reinheit der Blasten bei allen immunseparierten Patienten > 95 % (vgl. 3.3). Hiermit konnte erstmalig Patientenmaterial verwendet werden, welches bei Diagnosestellung keinen hohen Prozentsatz an Blasten aufwies.

Patient 0, welcher als einziger niedrige Blastenzahlen (52 %) besaß und für einen späteren Vergleich mit CD34-aufgereinigtem Material keinen CD34-MACS erhalten hatte, veranschaulichte die Notwendigkeit eines hohen Blastenanteils zum Zeitpunkt der Selektion sehr gut. So konnte bei ihm kein Anreicherungsereignis in der polyklonalen Analyse nachgewiesen werden (vgl. 3.5.2). Demgegenüber konnte Patient A, dessen einziger Unterschied zur PD-Strategie des Patienten 0 darin bestand, dass er einem CD34-MACS unterworfen worden war, eine Anreicherung in der polyklonalen Analyse vorweisen (vgl. 3.5.2).

Bei den gewählten Depletionsstrategien der einzelnen PD-Arme zeigte sich wiederum, dass diejenigen mit maximaler Vielfalt (Patient D) und diejenigen mit minimaler Fülle an Depletionsantigenen (Patienten 0 und A) mit geringerer Ausbeute an vielversprechenden Phagen verliefen als diejenigen Arme mit mittleren DA-Mengen.

So war bei Patient D (hohe DA-Vielfalt) nur ein einziger Phage selektioniert worden. Demgegenüber scheiterte Patient 0 (geringe DA-Vielfalt) bereits an der polyklonalen Analyse und verblieb ohne vielversprechenden Phagen.

Patient A (niedrige DA-Vielfalt) brachte ebenfalls nur einen einzigen vielversprechenden Phagen hervor, welcher auch bei Patient B mitselektioniert werden konnte (siehe Abbildung 22).

Ein möglicher Erklärungsansatz für das Phänomen, bei zu wenig DA keinen Anreicherungs-erfolg zu erhalten, wäre, dass hierbei zu viele unspezifische Phagen den eigentlichen Selektionsschritt erreichten. Resultierend wäre somit ein Gemisch aus mengenmäßig zu vielen Phagen, welche u.a. durch sterische Behinderungen bzw. unspezifische Wechselwirkungen um die Bindung an den AML-Zellen konkurrierten und letztlich die Anreicherung bzw. Bindung AML-spezifischer Phagen verhinderten.

Bei zu hohen Anzahlen an DA wiederum könnte es passieren, dass alle Phagen durch mehr oder minder spezifische Wechselwirkungen mit den Depletionszellen abgefangen werden würden. Etwaig vorhandene, eigentlich AML-spezifische Phagen könnten somit unspezifisch während der Depletion abgefangen und somit erst gar nicht in die eigentliche Selektion tradiert werden, welches gleichfalls eine AML-spezifische Anreicherung während des Selektionsprozesses verhindern würde (Smith und Petrenko 1997).

Eine wichtige Schlussfolgerung aus den Depletionsstrategien ist demgemäß, dass mittlere Anzahlen an DA zur Optimierung des PD gewählt werden sollten.

Bezüglich der zu wählenden Art der Depletion, d.h. der Verwendung einer Ficoll-Hypaque-Dichtegradientenzentrifugation, einer Erythrozytenlyse oder einer Erythrozytenlyse inklusive Monozyten-Adhärenzanreicherung, lässt sich mit selbiger Begründung die Erythrozytenlyse als effektivste Methode identifizieren.

So lieferte die Ficoll-Hypaque-Dichtegradientenzentrifugation die geringsten Ausbeuten an vielversprechenden Bindern (Patient 0 und A). Da diese Methode die Population der Granulozyten komplett ausschließt, zählt sie zu jenen Verfahren, welche nur geringe DA-Vielfalten bereitstellen, so dass gemäß obiger Erörterung die spärliche Binderausbeute erklärlich wird.

Die mittleren Depletionsantigendichten der Erythrozytenlyse (Patienten B und C) brachte indessen, wie bereits ausgeführt, die meisten vielversprechenden Binder ein (vgl. Abbildung 22). Sobald diese jedoch mit der Monozyten-Adhärenzanreicherung kombiniert (Patient D) und damit die maximal getestete Antigendichte erreicht wurde, wurde letztlich nur ein einziger Binder erhalten.

Dieses Ergebnis stimmte mit einem laborinternen Vorversuch überein, bei dem gleichfalls auf AML-Primärzellen selektioniert worden war. Auch hier hatte sich dieser Phage durchgesetzt, so dass er vermutlich als stärkster und renitentester AML bindender Phage der Tomlinson J klassifiziert werden kann.

Da jener Binder jedoch alle Zellpopulationen auch von gesunden Blutspendern erkannte und insgesamt ein stark positives Bindungsverhalten zeigte, wurde er bewusst nicht weiterverfolgt.

Das Durchsetzen dieses Binders im Zuge der PD-Strategie des Patienten D lässt sich zudem retrospektiv bereits anhand der berechneten Output- / Input-Titer erkennen. Diese nämlich waren im Gegensatz zu allen anderen PD-Strategien im Verlauf der SR stetig angestiegen und stellten sich rampenförmig dar. Demgegenüber verliefen die Output- / Input-Titer der anderen PD-Strategien sanduhrförmig, so dass der geringste Titer nach der 2. SR erreicht wurde (siehe 3.5.1).

Insgesamt lässt sich für vorliegende Arbeit postulieren, dass ein möglichst niedriger Output- / Input-Titer nach der 2. Selektionsrunde (möglichst $< 1 \cdot 10^{-7}$) sowie ein sanduhrförmiger Output- / Input-Titer-Verlauf über alle 3 SR hinweg (vgl. 6.4) mit der Generierung vielversprechender Binder bzw. mittleren DA in Zusammenhang steht.

Bezüglich der Monozyten-Adhärenzanreicherungen des Patienten D wäre zur Epikrise anzuführen, dass die mittlere Anreicherung von 68 % ggf. mittels FACS in dessen Funktion als Zellsortierer hätte gesteigert werden können (Wahl et al. 2006).

Zusammenfassend wurden in vorliegender Dissertation erstmalig AML-Primärzellen zur PD-Selektion anhand des Stammzellmarkers CD34 aufgereinigt. Gleichfalls wurde zum ersten Mal im Rahmen des PD auf ganzen Zellen das Ausnutzen der Depletion als zentrales Thema abgehandelt und ein Vergleich von fünf verschiedenen PD-Strategien für AML-Primärzellen durchgeführt.

4.3 Sequenzbewertungen der selektionierten Binder

4.3.1 Sequenzgleiche Phagen zwischen PD-Strategien

Entsprechend der Auswertung der 1408 Proben im Rahmen der monoklonalen Analyse (vgl. Abbildung 20) sind 53 von diesen zur Bestimmung ihrer Basenabfolge sequenziert worden. Nach Sequenzvergleich und Identifizierung einzigartiger Binder ergaben sich letztlich 11 verschiedene Sequenzen. Bei diesem Vergleich der Basenabfolgen wurden drei identische Sequenzen in je zwei unterschiedlichen Patienten gefunden (sog. Konsensus-Phagen).

Einer dieser sequenzgleichen Phagen war der bereits oben erwähnte Phage (4.2), welcher stets hoch positiv gesunde Blutzellen gebunden hatte. Dessen Sequenz fand sich bei den Selektionen für die beiden FAB M0-Primärblasten der Patienten A und D. Die beiden anderen sequenzgleichen Phagen fanden sich zum einen zwischen der FAB M0 des Patienten A und der FAB M5 des Patienten B sowie zum anderen zwischen der FAB M5 des Patienten B und der FAB M1 des Patienten C (siehe Abbildung 22).

Zudem wurde ein weiterer Phage angereichert, der durch einen laborinternen Vorversuch bekannt war, bei dem gleichfalls AML-Primärzellen zur Selektion verwendet wurden. Dieser wurde als sequenzgleich zu einem Phagen des Patienten C identifiziert. Diese Sequenzgleichheiten lassen folgende drei mögliche Erklärungsansätze zu:

Die erste Erklärungsmöglichkeit wäre eine Einschränkung der verwendeten Original-Bibliothek Tomlinson J hinsichtlich ihrer Diversität. Dies wäre – unabhängig von der gezielten Reduktion der Diversität durch spezifische Verminderung im Zuge der Selektion auf den Zielzellen – durch die dreimalige Amplifikation innerhalb einer jeden PD-Strategie prinzipiell möglich (Derda et al. 2011) (Kuzmicheva et al. 2009) und u.a. durch unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeiten der Phagen erklärlich.

So beschreiben Derda *et al.* (Derda et al. 2011) eindrücklich, dass nur geringe Wachstumsvorteile einzelner Phagen zu einem stetigen Verlust der Diversität im Rahmen jedweder Amplifikation führen. Vodnik *et al.* (Vodnik et al. 2011) ergänzen dazu passend, dass manche Phagen - beispielsweise bedingt durch Mutationen (Thomas et al. 2010) - Vorteile während der Infektion der Bakterien bzw. beim Zusammenbau des Virions nach stattgehabter Infektion besäßen, welche letztlich die schnellere Vervielfältigung vorantrieben.

Zudem führen die Autoren um Vodnik *et al.* (Vodnik et al. 2011) auch die Überlegung ins Feld, dass diese wie auch immer gearteten Amplifikationsvorteile mancher Phagen intrinsisch der Technik des PD innewohnen könnten. Somit wären sie Teil einer jeden PD-Strategie, sofern Amplifikationsschritte der Phagen enthalten wären. Die hieraus resultierenden, überzufällig häufig selektierten Binder bezeichnen die Autoren daher als *propagation-related* (der Vervielfältigung der Phagen geschuldet) (Vodnik et al. 2011) (‘t Hoen et al. 2012).

Daher sollten zur Vermeidung des vervielfältigungsbedingten Diversitätsverlustes maximal 3 - 4 SR pro PD-Strategie gewählt werden (Derda et al. 2011). Dies fand in vorliegender Dissertation mit der Durchführung nur dreier SR Berücksichtigung.

Dennoch kann eine gewisse Einschränkung der Diversität bedingt durch Amplifikation der Phagen nicht ausgeschlossen werden. Anhand der angegebenen Diversität der Tomlinson J von $1,37 \times 10^8$ unterschiedlichen Klonen (Geneservice o. J.) ist ein Auftreten derselben drei Klone in unabhängigen Selektionen ohne einen in irgendeiner Form ausgeübten Anreicherungs- bzw. Selektionsdruck allerdings recht unwahrscheinlich. Dies leitet daher zu zwei weiteren Erklärungsansätzen über.

Hierbei handelt es sich um die Theorien der nicht dem Zielantigen geschuldeten Phagen (selection-related bzw. non-target-related) und der dem Zielantigen geschuldeten (target-related) Phagen (Vodnik et al. 2011).

Unter den *non-target-related* Phagen versteht man diejenigen selektierten Phagen, welche nicht an das gewünschte Antigen - im vorliegenden Fall AML-Primärzellen - sondern an andere Dinge des Versuchsansatzes wie Plastik, bovines Serumalbumin (BSA), Cellulose o.ä. binden (Vodnik et al. 2011). Eine an dieser Stelle beispielhaft anzuführende *selection-related* Peptidsequenz, welche sehr häufig bei verschiedensten PD-Peptidselektionen unterschiedlichster Arbeitsgruppen selektiert wurde, ist gegen Streptavidin (SA) gerichtet, da SA häufig als Peptid-Tag zum Zwecke der späteren Aufreinigung von Proteinen in vielen Versuchsansätzen zu finden ist (Menendez und Scott 2005).

Als weiteres Beispiel für bereits beschriebene sequenzidentisch selektierte Phagen sind zudem Sasso *et al.* (Sasso et al. 2018) anzuführen. So beschreiben die Autoren um Sasso *et al.* (Sasso et al. 2018) einen zehnmarmigen PD-Selektionsansatz, welcher mit dem Ziel durchgeführt wurde, immunmodulatorische AK zu identifizieren. Bezüglich der sequenzidentischen scFv äußerten sie sich jedoch mit Bedacht und formulierten vorsichtig als Erklärung, dass diese ggf. Fc-Fragmente binden könnten, welche in allen Ansätzen vorhanden gewesen seien, da die Selektionen u.a. auf rekombinant hergestellten Fc-Fragment tragenden Proteinen durchgeführt worden wäre (Sasso et al. 2018).

Leider wurde weder berichtet, wie viele sequenzidentische Phagen vorhanden waren, noch ob man sie auf ihr vermutetes Target, dem Fc-Fragment, getestet hatte, ehe man eine Bindung annahm und sie aus weiteren Auswertungen exkludierte. Auch die Frage, ob manche dieser sequenzidentischen Binder nicht polyspezifisch waren und aus diesem Grunde in mehreren Strategiearmen zu finden waren, blieb offen.

Sasso *et al.* (Sasso et al. 2018) zeigen somit exemplarisch den vorsichtigen Umgang von Autoren mit der Selektion sequenzidentischer Binder in unterschiedlichen PD-Selektionen. Da zu vermuten ist, dass derartige Funde häufig als irrelevant abgetan, nicht publiziert oder nicht als bereits in einer anderen PD-Selektion beschrieben erkannt werden (Vodnik et al. 2011), ist es somit schwierig nachzuvollziehen, ob sequenzidentische Binder nicht doch häufiger auftreten, als bislang in der Literatur zu lesen ist. Der Review „*Phage Display: Selecting Straws Instead of a Needle from a Haystack*“ um Vodnik *et al.* (Vodnik et al. 2011) legt dies eindrücklich nahe und gewinnt durch vorliegende Dissertation Gewicht.

Der dritter Erklärungsansatz wäre der durch den PD gewünschte Fall, eine dem Zielantigen geschuldete Sequenzgleichheit im Sinne von Konsensus-Phagen, auf welche diverse Strategiearme bedingt durch das gewählte Zielantigen konvergieren.

Die in dieser Doktorarbeit selektierten sequenzidentischen Konsensus-Phagen wurden partiell weiterverfolgt, wobei besonders der Konsensus-Phage AK 35

hervorzuheben ist. AK 35 generierte die stärkste AML-Bindung und wurde sowohl in der Durchflusszytometrie als auch in der Konfokalmikroskopie als stark positiv für das gewählte Target getestet.

4.3.2 Sequenzgleiche CDR zwischen den selektionierten scFv

Wie anhand der Sequenzen der selektionierten scFv erkennbar wurde (vgl. Tabelle 14) und sich auch praktisch im Zuge der ortsspezifischen Mutagenese (2.8.5) durch Benutzung gleicher Primer niedergeschlagen hatte, wurden mehrere sequenzidentische CDR gefunden.

So teilen sich die AK 14, 22 und 44 dieselbe schwere Kette V_H , indessen die CDR2 und CDR3 der leichten Kette V_L divers sind. Ähnliches gilt für die Sequenzen der AK 24 und 35, wobei diese sich ausschließlich in der CDR3 der V_L unterscheiden (vgl. Tabelle 14). Passend hierzu ist auch bei Fitting (Fitting 2012) das Auftreten von Phagen, welche alle CDR - außer CDR3 der V_L - gemein haben, beschrieben worden.

Ob die AK mit gleicher V_H bzw. insbesondere mit gleicher CDR3- V_H dasselbe Epitop der AML erkennen, wie noch bei Fitting (Fitting 2012) angedacht, kann jedoch nicht mit Sicherheit abgeschätzt werden. So wurde einerseits für natürliche AK postuliert, dass die CDR3- V_H die wichtigste Antigen determinierende CDR ist (Tsuchiya und Mizuguchi 2016) (Kuroda et al. 2008) (Barbas III et al. 2004). Widerstreitend hierzu existiert jedoch Evidenz, dass entgegen natürlicher AK, welche dem natürlichen Rekombinationsprozess des Genoms einer B-Zelle unterworfen sind (Murphy et al. 2014), die CDR3 der V_L innerhalb synthetisch hergestellter Phagenbibliotheken wie der Tomlinson J viel höhere Relevanz hinsichtlich der Antigenbindung besitzt (Persson et al. 2013).

Bzgl. der Bevorzugung einer bestimmten V_H -Sequenz lässt sich überdies vermuten, dass sich jene gleichen V_H -Sequenzen besonders vorteilhaft zur bakteriellen Herstellung eignen und begünstigt durch den Selektionsprozess auf AML-Zellen die Chance bekommen hatten, sich anzureichern. Gemäß diesen Überlegungen müsste es sich bei den sequenzgleichen CDR somit um ein Zusammenspiel zwischen PD-Selektionsprozess und bakteriellem Wachstumsvorteil handeln.

Auch die bereits in der Literatur vielfach beschriebene paradoxe Selektion Ambercodon tragender Phagen im Rahmen der Benutzung der Tomlinson J (siehe Ausführungen unter 1.3.3.1) würde diese These stützen. Es wäre anzunehmen, dass sich Ambercodon tragende Strukturen leichter für das Bakterium herstellen lassen, wie bereits die Autoren um Marcus *et al.* (Marcus, Wang, et al. 2006) postulierten.

Eine Anreicherung ambercodonhaltiger Phagen wäre zudem durch eine gewisse Spezifität der Phagen bzgl. des gesuchten Targets erleichtert. Allgemeine bakterielle

Herstellungsvorteile gepaart mit Antigenspezifität wäre folglich ein weiterer Erklärungsansatz des hier beobachteten Phänomens, gleiche CDR-Sequenzen zu erhalten.

4.4 Bindungsverhalten der selektierten scFv-Fc

4.4.1 Überprüfung von Kreuzreaktivitäten

Die Testung der Bindung der selektierten scFv-Fc auf Zelllinien (3.9.1) diente dem näheren Eingrenzen der ursprünglich sieben vielversprechenden AK. Auf deren Grundlage basierte die Auswahl der Binder 11, 22, 24 und 35 zur weiteren Testung auf AML-Primärzellen sowie gesunden Blutspenderzellen.

Da die Zelllinie Kasumi-1 als Zelllinie für funktionelle Versuche Verwendung finden sollte, wurden nur diejenigen scFv-Fc für eine weitere Charakterisierung in Betracht gezogen, welche Kasumi-1-Zellen erkannten. Die Binder 33 und 44 mussten daher fallengelassen werden. Der AK 14 fiel gleichsam aus dem Raster, da er viele Zelllinien erkannte, die keine AML-Zelllinien waren, und damit sehr unspezifisch zu sein schien (vgl. 3.9.1).

Daraufhin wurde in Rahmen dieser Dissertation entschieden, allein mit den AK 11, 22, 24 und 35 weiterzuarbeiten.

4.4.2 Bindung auf AML-Primärzellen und AML-Zelllinien

Bezüglich der Bindungscharakterisierung der scFv-Fc auf AML-Primärzellen bzw. AML-Zelllinien muss zunächst zwischen der Testung auf Phagenebene im konventionellen Durchflusszytometer und jener auf Proteinebene (scFv-Fc-Fusionsprotein) im spektralen Durchflusszytometer unterschieden werden.

Die Testung der scFv-Phagen als Einzelphagen lieferte eine komplette Negativität für gesundes peripheres Blut, indessen die getesteten AML-Primärzellen der Patienten A, B, C und D stark positiv zeichneten (siehe 3.5.4 inkl. Abbildung 21).

Nach Umklonierung in den pMS2-Vektor und damit Fusionierung mit dem IgG2a-Maus-Fc-Fragment wurden daraufhin die scFv-Fc erneut auf AML-Primärzellen (3.11.1, 3.10.2) sowie auf den AML-Zelllinien Kasumi-1 und Kasumi-3 (3.9.1) getestet.

Auffallend war hierbei eine Verminderung der Fluoreszenzmesswerte der scFv-Fc gegenüber denjenigen Werten, welche sie noch als scFv-Phagen lieferten. Dieses Phänomen lässt sich erklären, da zur Testung der Einzelphagen der Hyperphage M13K07 Δ pIII Verwendung fand (siehe 1.3.5). Daher waren die getesteten Phagen pentavalent, die hergestellten scFv-Fc jedoch bivalent. Eine geringere Avidität der scFv-Fc war somit das Resultat der Expression als Fc-tragender AK.

Zur Testung der scFv-Fc wurden Patienten der FAB M0 bis M2 sowie M5 verwendet. Als AML-Zelllinien kamen des Weiteren die Kasumi-1 (FAB M2) sowie die Kasumi-3 (FAB M0) zum Einsatz.

Alle getesteten leukämischen Blasten zeichneten für den Marker CD34 positiv, so dass sich die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation auf CD34+ Zellen übertragen lassen. Zudem ist die Erkenntnis bemerkenswert, dass CD34+ AML-Primärzellen mit steigendem Ausreifungsgrad der jeweiligen AML - u.a. abgebildet durch eine höhere FAB-Einordnung - stärker durch die AK gebunden werden.

So wird die FAB M0 des Patienten A nur von zweien der vier getesteten scFv-Fc erkannt, nämlich von AK 22 und AK 35 (siehe Tabelle 16). Die FAB M0 des Patienten D wird indessen ausschließlich von AK 35 erkannt und die FAB M0 der AML-Zelllinie Kasumi-3 wird sogar von keinem der Binder erfasst (siehe Tabelle 15). Alle anderen getesteten blastären AML-Primärzellen (FAB M1, M2 und M5) sowie die FAB M2 der Zelllinie Kasumi-1 (vgl. Tabelle 15, Tabelle 16) werden jedoch von allen vier Fusionsproteinen stark gebunden.

Die AML des Patienten B, FAB M5, muss hier besonders hervorgehoben werden, da alle scFv-Fc sowohl die darin enthaltenen Blasten als auch die nicht blastären Zellen (Phänotyp: CD45+CD34-) stark binden. Zwar werden auch die nicht blastären Zellen des Patienten C, FAB M1, durch den AK 24 schwach erkannt, doch zeichnen alle anderen AK negativ für diese nicht blastären Zellen. Dass somit alle Zellpopulationen des Patienten B gebunden werden, ist ein interessantes Ergebnis, welches zur genaueren Einsicht in die Entwicklung dieser AML Anlass gibt.

So ist diese Monoblastenleukämie (FAB M5) auf Boden einer klassischen JAK2 Exon 14 V617F-Mutation, molekularpathologisch begutachtet durch das hiesige Institut für Pathologie, entstanden. Diese Mutation ist bekannt für ihr Auftreten im Rahmen von myeloproliferativen Erkrankungen (Kralovics et al. 2005).

Die Leukämie des Patienten B war sekundär auf Boden eines myeloproliferativen Syndroms entstanden und hatte zudem eine gut ausgereifte, monozytäre Differenzierung (FAB M5).

Als Vorgriff auf die Diskussion der Analyse der Bindung auf gesunden Blutspenderzellen (siehe 3.11.2 sowie 4.4.3) soll an dieser Stelle angeführt sein, dass die selektionierten scFv-Fc eine erhöhte Spezifität für Monozyten gesunder Blutspender besitzen. In Anbetracht des monozytären Differenzierungsstandes der FAB M5 wird daher die gute Bindung an die Blasten dieser Leukämie nachvollziehbar.

In Zusammenschau mit dem vorherigen JAK2-bedingten myeloproliferativen Syndrom mit anzunehmender klonaler Hämatopoese, aus der sowohl der maligne Leukämieklon als auch alle nun positiven nicht blastären Zellen seinen / ihren Ursprung nahmen, wird

das Erkennen der nicht blastären Zellen erklärlich. Es stellt somit eine logische Schlussfolgerung aus Patientenanamnese und weiteren Ergebnissen dieser Dissertation dar.

4.4.3 Bindung auf gesunden Blutspenderzellen

Die Bindung der scFv-Fc auf gesunden Blutspendern (siehe Tabelle 17) ergab eine Negativität für die Populationen der Lymphozyten sowie der Granulozyten aller vier getesteten Spender. Allein die Population der Monozyten der gesunden Spender wurde durch die AK erkannt.

Interessanterweise hatten alle vier selektierten AK Monozyten unabhängig davon gebunden, ob es sich um einen weiblichen oder männlichen Spender handelte. Auch das Alter spielte augenscheinlich keine Rolle. Lediglich eine genetische Komponente bzgl. Stärke der Expression des jeweiligen Antigens ist anzunehmen, da der männliche Spender der Blutgruppe A und der weibliche Spender der Blutgruppe 0 ähnlich niedrige Fluoreszenzmesswerte besaßen, vermutlich bedingt durch ihren nahen Verwandtschaftsgrad.

Im Rahmen dieser Arbeit war zudem zu diskutieren, ob vier unabhängig voneinander selektierte AK alle rein zufällig Monozytenspezifität besitzen könnten. So war insbesondere der Fc-Rezeptor (FcR) der Monozyten zu bedenken, da eine vermeintliche monozytäre Spezifität ggf. auch durch unspezifisches Abfangen des Fc-Anteils des scFv-Fc durch einen FcR bedingt sein könnte, zumal als Einzelphagen getestet der gesunde Spender keinerlei Positivität gezeigt hatte (siehe Abbildung 21).

Fc-Rezeptoren sind auf der Oberfläche von Monozyten (z.B. der Rezeptor CD64) physiologischer Weise dazu befähigt, Immunglobuline, d.h. AK, unabhängig von deren eigentlichen Spezifitäten allein über deren Fc-Anteil zu binden (Andersen et al. 2016) (Connor et al. 1991) (Luo et al. 2018).

Daher wurden zum Ausschluss einer unspezifischen Bindung des Fc-Teils der AK an den FcR der Monozyten mehrere Blockungsschritte zur FACS-Messung eingebaut. So wurden alle Zellen vor Färbung mit einem AK zunächst mit 10 %-igem AB-Serum inkubiert. Dieses Serum eines Spenders der Blutgruppe AB sollte den zu messenden Monozytenpopulationen den FcR blockieren, indem die im Serum enthaltenen Immunglobuline den FcR besetzen und damit den Rezeptor zum unspezifischen Abfangen der zu testenden scFv-Fc unbrauchbar machen sollten (Andersen et al. 2016). Ein zusätzlich im Verlauf eingesetztes 10 %-iges Mäuseserum sollte zudem den Überschuss an verwendetem Sekundär-AK gamFitc, welcher zur Ortung des gefärbten scFv-Fc verwendet wurde, restlos eliminieren. Wäre dieser Schritt entfallen, hätten sich Reste des Sekundär-AK gamFitc ggf. an die murinen Fc-Anteile weiterer zur Färbung

benutzter AK wie z.B. an den AK CD34-Fitc, der zur Ortung der Blasten diente, heften und so falsch-positive Ergebnisse verursachen können.

Trotz dieser Blockungsschritte des FcR blieben die scFv-Fc jedoch weiterhin deutlich positiv auf den Monozyten der getesteten gesunden Blutspender, so dass von einer spezifischen Antigenbindung ausgegangen werden muss.

Zusammenfassend lässt sich somit für alle vier getesteten AK eine Negativität für Lymphozyten und Granulozyten bei Positivität für Monozyten auf gesunden Blutspendern festhalten.

4.5 Internalisierungsverhalten der selektionierten scFv-Fc

Zur weiteren Charakterisierung der AK 11, 22, 24 und 35 wurde der funktionelle Versuch einer Internalisierung mithilfe der AML-Zelllinie Kasumi-1 durchgeführt. Dieser Versuch wurde sowohl in der Konfokalmikroskopie (siehe 3.10.1) als auch mittels konventioneller Durchflusszytometrie (siehe 3.9.3) im Resultat als positiv bestätigt, so dass von einer Internalisierung aller vier getesteten Antikörper auszugehen ist.

Diese Erkenntnis ermöglicht, über funktionelle Koppelungen der AK zur Entwicklung zielgerichteter Therapien nachzudenken, da durch die Internalisierungseigenschaften die Möglichkeit einer Konjugation mit einem Toxin oder β -Strahler für das zielgerichtete Einschleusen von zytotoxischen Wirkstoffen respektive Strahlung bestünde (Harper et al. 2013).

Dies wäre in Analogie zu dem bereits auf dem Markt befindlichen Immunkonjugat Gemtuzumab-Ozogamicin (GO) (Rowe und Lowenberg 2013) zu sehen. Dieses stellt ein Fusionsprodukt aus dem CD33-spezifischen AK Gemtuzumab und dem zytotoxischen, DNA bindenden Antibiotikum Calicheamicin (Ricart 2011) dar und kommt zur Therapie der CD33-positiven AML zum Einsatz (Gbadamosi et al. 2018).

Für eine sichere Anwendung der hier selektionierten AK wäre allerdings die Kenntnis des Zielantigens wünschenswert, so dass etwaige Kreuzreaktivitäten mit anderen Geweben abgeschätzt werden könnten. Zudem wäre für eine klinische Anwendung der vier AK deren Monozyten bindende Eigenschaft auf Vor- und Nachteile abzuwägen sowie zu berücksichtigen, dass alle Monozyten bindende AK auf CD34+ Blasten getestet und selektioniert wurden.

Demgemäß war der hämatopoetische Stammzellmarker CD34 (Sidney et al. 2014) stets auf allen positiv getesteten Leukämiezellen vorhanden, welches eine Überprüfung der Bindungseigenschaften bzgl. gesunder hämatopoetischer Stammzellen vor einem klinischen Einsatz erstrebenswert macht.

All dies eröffnet Möglichkeiten für weitere Forschung.

Zusammenfassung

Die Bedeutung des Einsatzes monoklonaler Antikörper (AK) zur zielgerichteten Immuntherapie sowohl benigner als auch maligner Erkrankungen nimmt durch Etablierung kostengünstiger und effektiver Techniken zur Entwicklung und Herstellung neuer AK stetig zu. Eine dieser Techniken ist die Phage Display Technologie (PD).

Diese macht sich zunutze, dass Antikörperfragmente (scFv) oder Fusionsproteine, welche auf dem Genom eines Phagen codiert sind, direkt auf der Oberfläche desselben präsentiert werden. Die Analyse von Interaktionen der präsentierten Proteine mit anderen Zellen, Proteinen etc. zur Identifizierung neuer Zielstrukturen wird so erleichtert. In vorliegender Arbeit sollten mithilfe des PD Oberflächenstrukturen von Primärzellen der Akuten Myeloischen Leukämie (AML) näher charakterisiert werden. Hierfür fand die wissenschaftlich etablierte scFv-PD-Bibliothek Tomlinson J Anwendung.

Zunächst war eine Optimierung hinsichtlich der Selektion auf unversehrten Zellen erforderlich, so dass fünf neuartige experimentelle PD-Strategien erfolgreich etabliert werden konnten, welche Variationen bzgl. Selektion und Depletion enthielten.

Eine Aufreinigung durch immunmagnetische Separation zum Erhalt hochreiner AML-Zielzellen sowie eine vorherige Depletion auf gesunden Blutspenderzellen in mittleren Antigendichten zum Abfangen unspezifischer Binder erwiesen sich dabei am vorteilhaftesten. Nach Klonierung vielversprechender Binder in ein phagenunabhängiges AK-Format (scFv-Fc) zeigten diese eine Bindung sowohl auf AML-Zellen – mit höherem Ausreifungsgrad stärker – als auch auf gesunden Monozyten. Daher sind die in dieser Arbeit selektionierten AK als AML- und monozytenspezifisch zu charakterisieren. Des Weiteren konnte eine Internalisierung von vier der getesteten AK nachgewiesen werden, so dass eine Funktionalisierung als Antikörper-Wirkstoff-Konjugat denkbar ist.

Während der Sequenzierung der erhaltenen AK wurden überdies Sequenzgleichheiten zwischen einzelnen PD-Strategien festgestellt. Die Selektion gleicher Sequenzen wird in der Literatur auf dreierlei Faktoren zurückgeführt: die Amplifikation der Phagen, die Experimentierbedingungen und das Zielantigen. Bemerkenswert ist hierbei, dass einer dieser sequenzgleichen Binder unter allen selektionierten AK dieser Dissertation der stärkste und effektivste AML bindende AK war.

Zusammenfassend konnte somit die PD-abhängige Generierung von humanen AK gerichtet gegen Primärzellen der AML durch Variation der Selektions- und Depletionsbedingungen erfolgreich optimiert und ein breites Spektrum an AML bindenden AK erhalten werden. Ihre Evaluation als zielgerichtetes Immuntherapeutikum verbleibt für weitere Forschung.

5.1 Summary

In the past few decades, the importance of monoclonal antibodies in benign and malignant disorders has increased steadily due to affordable and improved procedures of antibody generation such as the phage display technology (PD).

PD uses the nature of bacteriophages to display fusion proteins at their surfaces when inserted in their genome. This allows to study interactions of those inserted proteins (e.g. single-chain fragment variables [scFv]) with other proteins or cells.

In this research, our aim was to study the surface of acute myeloid leukaemia (AML) blasts by means of the well-known ScFv Phage Display Library Tomlinson J.

Initially, the PD method had to be adapted to AML blasts. Therefore, after conducting a comprehensive literature research, we established five novel PD selection strategies by varying the depletion and panning process, respectively.

We have conducted depletion strategies by changing levels of antigen diversities, in which medium levels seemed to be most encouraging. With regard to the panning procedure, we have performed a CD34 immunomagnetic separation in order to get high percentages of blasts.

Next, we produced phage-independent antibody fragments (scFv-Fc) and showed their binding activity towards AML cells as well as healthy monocytes. Four antibodies were tested positive for internalising activity. Hence, an application as immunoconjugate for immunotherapy can be easily conceivable.

Moreover, sequence similarities among the different conducted selection procedures were seen. In literature, similar sequences are attributed to three factors: the amplification of phages by bacteria, the experimental environment, and the targeted antigen. Remarkably, one of the phages with shared sequences had the strongest AML binding capability among all selected antibodies in this dissertation.

To sum up, we presented a PD-dependent generation of human antibodies directed against primary AML blasts by optimising selection and depletion processes. Furthermore, we developed a large number of AML-binding antibodies being now available for further research regarding their application as immunotherapeutic agents.

Anhang

6.1 PubMed-Recherche

6.1.1 Suchdetails

Nachfolgend sind die Suchdetails der PubMed-Suche als Screenshot dargestellt, welche zur Literaturrecherche, erörtert unter 2.1, Verwendung fanden.

Search Details

Query Translation:

```
((("bacteriophages"[MeSH Terms] OR "bacteriophages"[All Fields] OR "phage"[All Fields]) AND display[All Fields]) AND ("leukemia, myeloid, acute"[MeSH Terms] OR ("leukemia"[All Fields] AND "myeloid"[All Fields] AND "acute"[All Fields]) OR "acute myeloid leukemia"[All Fields] OR ("acute"[All Fields] AND "myeloid"[All Fields] AND "leukemia"[All Fields])))
```

Search URL

Result:
21

Translations:

phage	"bacteriophages"[MeSH Terms] OR "bacteriophages"[All Fields] OR "phage"[All Fields]
acute	"leukemia, myeloid, acute"[MeSH Terms] OR ("leukemia"[All Fields] AND "myeloid"[All Fields] AND "acute"[All Fields]) OR "acute myeloid leukemia"[All Fields] OR ("acute"[All Fields] AND "myeloid"[All Fields] AND "leukemia"[All Fields])

Database:
PubMed

User query:
(phage display) AND acute myeloid leukemia

Abbildung 29: Search Details der PubMed-Suche

Zur Vervollständigung der Query Translation, welche bereits unter 2.1 angegeben wurde, sind als Screenshot die Suchdetails angegeben. Die Suchdetails mit den angegebenen 21 Ergebnissen gelten für den Zeitraum bis Ende November 2016.

6.2 Detaillierte Materialaufstellung

Nachfolgend seien, wie unter 2.2 erwähnt, die verwendeten Materialien detailliert tabellarisch dargestellt.

6.2.1 Antibiosen

Antibiosen	Einsatzkonzentration	Hersteller
Ampicillin	100 µg/ml	Sigma Aldrich
Kanamycin	50 µg/ml	Life Technologies
Penicillin/Streptomycin (P/S)	1 %-ig im Kulturmedium	Life Technologies
Zeocin	100 µg/ml	Life Technologies

6.2.2 Enzyme

Enzyme	Aktivität	Hersteller
Antarktische Phosphatase	5 U	New England Biolabs
DpnI	10 U	Thermo Fisher Scientific
NotI-HF	20 U	New England Biolabs
Pfu-DNA-Polymerase	2,5 U	Thermo Fisher Scientific
SfiI	20 U	New England Biolabs
T4-DNA-Ligase	400 U	New England Biolabs
Taq-DNA-Polymerase	1,25 U	Life Technologies

6.2.3 Kits

Kit	Verwendungszweck	Hersteller
CD34 MicroBead Kit, human	Aufreinigung der Patientenblasten zur Phage-Display-Selektion	Miltenyi Biotec
DyeEx 2.0 Spin Kit	Aufreinigung des Sequenzier-PCR-Produktes mittels Einzelsäulen	Qiagen
DyeEx 96 Kit	Aufreinigung des Sequenzier-PCR-Produktes im 96-well-Format	Qiagen
JETQUICK Gel Extraction Spin Kit	Aufreinigen der Kolonie-PCR nach Agarosegelelektrophorese	Genomed
QIAquick PCR Purification Kit	Aufreinigung Kolonie-PCR-Produkte	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Präparation nach angelegter Übernachtkultur von Bakterien zum Erhalt der Plasmide	Qiagen

6.2.4 Molekulargewichtsmarker

Marker	Verwendungszweck	Hersteller
GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder	Agarosegelelektrophorese	Thermo Fisher Scientific
Magic Marker™ XP Western Protein Standard	Chemilumineszenz Westernblot	Thermo Fisher Scientific
Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder	SDS-PAGE, Westernblot, Coomassie	Thermo Fisher Scientific

6.2.5 Antikörper

Antikörper	Beschreibung	Verwendungszweck	Hersteller
Anti-M13 (= unkonjugiert)	Monoklonal, Maus	Guava-FACS, 1 : 5.000 in WP-FACS, Phagenfärbung	GE Healthcare
CD14PE (= Phycoerythrin)	Klon 63D3 Lot B210234	Guava-FACS	Biolegend
CD34Fitc (= Fluorescein- isothiocyanat)	Klon 581 Lot B213405	Guava-FACS, Konfokalmikroskopie	Biolegend
CD34PE	Klon 581 Lot B225894	SONY-FACS	Biolegend
CD45PerCP (= Peridin Chlorophyll Protein)	Klon HI130 Lot B231397	Guava-FACS, SONY- FACS	Biolegend
FcR Blocking Reagent, human	Humanes IgG	MACS-Beads	Miltenyi Biotec
Gout-anti-mouse- Fitc (= gamFitc)	IgG / IgM, polyklonal, Ziege Lot 6287542	Guava-FACS, SONY- FACS, Konfokalmikroskopie, 1 : 50 in WP-FACS	BD Biosciences
Isotype-Control Fitc	Klon MOPC-21 Lot B213387	Guava-FACS	Biolegend
Isotype-Control PE	Klon MOPC-21 Lot B220359	Guava-FACS	Biolegend

Isotype-Control PerCP	Klon MOPC-21 Lot B189355	Guava-FACS	Biolegend
Rabbit-anti- mouse-HRP (= horseradish peroxidase)	Polyklonal, Kaninchen	Westernblot- Sekundärantikörper, 1 : 5.000 in TBST-M	Dako

6.2.6 Laborgeräte

Gerät	Klassifikation / Hersteller
Bakterieninkubator	UN30 / Memmert GmbH + Co. KG
Bench (steril)	MSC-Advantage Class II Biological Safety Cabinet / Thermo Fisher Scientific Tecnoflow 2F120-IIGS / INTEGRA Biosciences GmbH
Blotgel-Kammer	XCell SureLock™ Electrophoresis Cell / Life Technologies
Brutschrank	HERAcell 150i CO ₂ Incubator / Thermo Fisher Scientific
Durchflusszytometer, Spektralanalysator	Guava easyCyte HT / Merck Millipore SP6800 Spectral Analyzer / SONY Biotechnology Inc.
Elektrophoresekammer	Compact M / Biometra GmbH
Generator	PS 300 T Mini Power Pack / Biometra GmbH E835 / Consort bvba
Heizblock	Thermomixer Comfort / Eppendorf AG
Inkubationsschüttler	KS15 mit Inkubationshaube TH 15 / Edmund Bühler GmbH KS 4000 ic control / IKA -Werke GmbH & Co. KG
Einfriergerät	Mr. Frosty / Thermo Fisher Scientific
Konfokalmikroskop	LSM800 / Carl Zeiss AG
Lichtmikroskop	Axioskop 50 / Carl Zeiss AG PrimoVert / Carl Zeiss AG
MACS-Magnete & MultiStand	MACS-Separator / Miltenyi Biotec
OD-Messgerät	Ultrospec10 / AmershamBiosciences
PCR-Maschine	Hybaid PCR-Sprint Thermal Cycler / Thermo Fisher Scientific

- Anhang -

	T100™ Thermal Cycler / Bio-Rad Laboratories Inc. Veriti™ 96-Well Fast Thermo Cycler / Life Technologies
PCR-Arbeitsplatz	UVC / T-M-AR UV-cabinet for PCR operations/Grant-bio Instruments
Phagen-Arbeitsplatz	DNA / RNA UV-Cleaner UVT-B-AR / Biosan
pH-Meter	HI 2211 / Hanna Instruments Deutschland GmbH
Pipetten	Transferpipetten / Brand GmbH + Co. KG ReasearchPlus / Eppendorf AG Pipetgirl / INTEGRA Biosciences GmbH
Reaktionsgefäß-Rotator (= Eppi-Rotator)	Rotary Mixer / Hartenstein
Sequencer	3730xl DNA Analyzer / Hitachi
Schüttler	Unimax1010 / Heidolph Instruments Duomax1030 / Heidolph Instruments
Spektrophotometer	NanoDrop 1000 / Thermo Fisher Scientific
Ultratiefkühlschrank	HERAfreeze™ HFU T Series / Thermo Fisher Scientific
UV-Tisch	IL-200 / Bachhofer Laboratoriumsgeräte GmbH
VE-Anlage	Direct-Q 3 / Merck Millipore Barnstead™ GenPure™ xCAD Plus / Thermo Fisher Scientific
Vortex	Genie2 / Bender&Hobein AG RS-VA 10 / Phoenix Instrument
Waage	Kern410 / Kern&Sohn GmbH
Wasserbad	WNE / Memmert GmbH + Co. KG
Westernblot-Kammer	Mini Trans-Blot® Cell / Bio-Rad Laboratories Inc.
Zählkammer	Neubauer / Paul Marienfeld GmbH & Co. KG
Zentrifugen	Centrifuge 5415 R / Eppendorf AG PCV-240 / Grant-bio Instruments Sigma 3K30 / Sigma Laborzentrifugen GmbH Heraeus Multifuge X3 FR / Thermo Fisher Scientific Heraeus Megafuge 16R / Thermo Fisher Scientific Cytospin™ 4 / Thermo Fisher Scientific 4K15 Centrifuge / Sigma Laborzentrifugen GmbH

6.2.7 Verbrauchsmaterial und Reagenzien

Verbrauchsmaterial bzw. Reagenz	Hersteller
2xYT (Yeast Extract Tryptone) Difco™ Medium	BD Biosciences
6xLadepuffer	Thermo Fisher Scientific
48-well Kulturplatte COSTAR®	Corning Inc.
96-well Kulturplatte CELLSTAR®	Greiner Bio-One
AB-Serum	Mit freundlicher Genehmigung des Instituts für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin, Leiter: Prof. Dr. G. Bein, Ethikvotum AZ 05/00
Agarose	Biozym Scientific GmbH
Ampicillin	Sigma-Aldrich
Bacto™ Agar	BD Biosciences
Big Dye™ Mix (Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit)	Life Technologies
Big Dye™ Puffer	Life Technologies
Blutentnahme-Röhrchen (S- Monovette®) (Lithium-Heparin bzw. EDTA)	Sarstedt AG & Co. KG
Bolt™ 8% Bis-Tris Plus Gel	Thermo Fisher Scientific
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Chemiluminsezenz- Westernblot (Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent)	GE Healthcare Life Sciences
CutSmart®Buffer, Restriktionsverdau	New England Biolabs
Cytofunnel™ (EZ Single)	Thermo Fisher Scientific
dNTP-Mix	GE Healthcare Life Sciences
DPBS (1X)	Life Technologies

- Anhang -

DTT (1 M)	AppliChem
EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat	Merck
Erythrozytenlysereagenz, BD Pharm Lyse™	BD Biosciences
Falcon-Tubes (15 ml, 50 ml) = Zentrifugenröhrchen	Greiner Bio-One, CELLSTAR
Fixierkleber Fixogum	Marabu
FlowCytometry Tubes	Sarstedt AG & Co. KG
Fetal Bovine Serum (FBS)	Life Technologies
Filter (steril 0,22 µm / 0,45 µm)	Merck Millipore
Filterpapier Westernblot Immobilon™	Merck Millipore
FuGENE® HD Transfection Reagent	Promega
Gel Loading Dye, Purple (6x)	New England Biolabs
GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (10.000X)	Biotium
Glukose-D(+)	Sigma-Aldrich
Glycerol	Carl Roth GmbH+Co.KG
Helferphage M13K07	New England Biolabs
HiDi-Formamid	Life Technologies
Hyperphage M13K07ΔpIII	PROGEN Biotechnik GmbH
Imidazol	AppliChem
Isopropyl-β-D- thiogalactopyranosid (IPTG)	Carl Roth GmbH+Co.KG
Kanamycin	Life Technologies
Lymphoprep™ (Ficoll- Hypaque)	Axis-Shield
MACS-Columns (MS, LS)	Miltenyi Biotec
Mäuseserum (Normal Mouse Serum Control)	Thermo Fisher Scientific
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich

- Anhang -

Methanol	Honeywell-Riedel-de Haën®
Milchpulver	Carl Roth GmbH+Co.KG
MgCl ₂	Life Technologies
Natriumazid (NaN ₃)	Merck-Schuchardt
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH+Co.KG
NiNTA Superflow - Säulchen	Qiagen
NuPAGE® 4 - 12 % Bis-Tris-Gel	Life Technologies
NuPAGE® LDS Sample Buffer (4X)	Life Technologies
NuPAGE® MES SDS Running Buffer (20X)	Life Technologies
NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (20X)	Life Technologies
Objektträger SuperFrost®Plus Deckgläser inkl.	R. Langenbrinck GmbH
OD-Messküvetten	Sarstedt, AG & Co. KG, Ref. 67.742
Parafilm	Bemis Company
Paraformaldehyd	Affymetrix / USB
PCR-Puffer, 10x	Life Technologies
PCR-Wasser (= Nuclease-Free-Water, PCR-H ₂ O)	Qiagen
Petrischalen	VWR International GmbH
Phagenbibliothek Tomlinson J	Medical Research Council, Centre for Protein Engineering, Cambridge
Pipettenspitzen	Klein bis 1250 µl: VWR International GmbH, Nerbe plus GmbH Groß bis 25 ml: Greiner Bio-One, CELLSTAR®, Sarstedt AG & Co. KG
Polyethylenglykol (PEG) 6.000	Carl Roth GmbH+Co.KG

- Anhang -

Ponceau-S-Lösung	Sigma Aldrich
Safety-Multifly®-Kanülen	Sarstedt AG & Co. KG
Sytox™ Blue dead cell stain	Life Technologies
T4-DNA-Ligase-Reaction-Buffer	New England Biolabs
Tween®20	Sigma Aldrich
Transfermembran Immobilon-P Westernblot	Merck Millipore
Triethylamin (TEA)	Sigma Aldrich
Tris	Carl Roth GmbH+Co.KG
Tris-HCl	United States Biochemical Corp.
UltraComp eBeads, Spectralcompensation, (Lot 4340903)	Thermo Fisher Scientific
RPMI Medium 1640 + GlutaMAX™ (= RPMI)	Life Technologies
Reaktionsgefäße / PCR-Tubes	Sarstedt AG & Co. KG, Biozym Scientific, Eppendorf
Trypanblau 0,4 %	Life Technologies
Trypsin-EDTA 0,25 %	Life Technologies
Vectashield Mounting Medium with DAPI	Vector Laboratories
Viva Spin Turbo 15	Sartorius
Waymouth's MB 752/1 Medium	Life Technologies
Zellkultureinfriermedium (Freezing Medium)	Life Technologies
Zellkulturflaschen (T25, T75, T175)	Sarstedt AG & Co. KG

6.2.8 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
2 % (bzw. 4%) PBS-M	2 % (bzw. 4 %) Milchpulver in PBS

- Anhang -

10 % AB-Serum	10 % AB-Blutgruppenserum in WP-FACS
1 % PFA	1 % Paraformaldehyd in PBS
10 % Mäuseserum	10 % Mäuseserum in WP-FACS
Blottingpuffer	20 % Methanol + 10 % Towbin gelöst in aqua dest.
Coomassie	0,25 % Coomassie-Brilliant-Blau G250 + 40 % Methanol + 10 % Eisessig gelöst in aqua dest.
Elutionspuffer (für NiNTA-Aufreinigung, pH = 8,0, filtriert)	50 mM NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O + 300 mM NaCl + 250 mM Imidazol
Equilibrierungspuffer (für NiNTA-Aufreinigung, pH = 8,0, filtriert)	50 mM NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O + 300 mM NaCl + 10 mM Imidazol
2xYT-Glycerol	8,5 ml 2xYT-Medium + 1,5 ml Glycerol + 20 µl Ampicillin (der Konzentration 100 µg/ml) + 0,1 g Glucose
MACS-Puffer	0,5 % BSA + 2 mM EDTA gelöst in 1XPBS, pH = 7,2
PBS (10X) pH = 7,4	1,37 M NaCl + 27 mM KCl + 0,1 mM Na ₂ HPO ₄ + 17,6 mM KH ₂ PO ₄ gelöst in 1000 ml aqua dest.
PBS-T	0,1 % Tween [®] 20 gelöst in 1XPBS
PEG-NaCl	20 % PEG 6.000 + 2,5 M NaCl gelöst in 250 ml aqua dest.
Restriktionsverdaupuffer	50 mM KCH ₃ CO ₂ , 20 mM Tris-Acetat, 10 mM Mg(CH ₃ COO) ₂ , 1 mM DTT
TAE (50X) pH = 8,0	242 g Tris + 57,1 ml Essigsäure + 0,5 M EDTA gelöst in 1000 ml aqua dest.
TBS (20X)	18 g Tris + 137 g HCl + 175,6 g NaCl gelöst in 1000 ml aqua dest.
TBST	0,1 % Tween [®] 20 gelöst in 1XTBS
TBST-M	5 % Milchpulver gelöst in TBST
Towbin (10X)	1,92 M Glycin + 250 mg SDS + 0,25 M Tris gelöst in 1000 ml aqua dest.
Waschpuffer (für NiNTA-Aufreinigung, pH = 8,0, filtriert)	50 mM NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O + 300 mM NaCl + 20 mM Imidazol
Westernblot (2X) Sample Buffer	50 % NuPAGE [®] LDS Sample Buffer (4X) + 10 % 1 M DTT gelöst in aqua dest.

WP-FACS (Waschpuffer für FACS)	0,2 % BSA + 0,1 % NaN ₃ gelöst in 1XPBS
Zelldissoziationsreagenz pH = 7,4	0,04 M Tris-HCl + 1 mM EDTA + 0,15 M NaCl auf 250 ml aqua dest.

6.2.9 Nährmedien und Agar

Bezeichnung	Zusammensetzung
2xYT-Agar	3,75 g Bacto™ Agar gelöst in 250 ml 2xYT-Medium
2xYT-Agar ^{AMP/GLU}	100 µg/ml Ampicillin + 1 % Glukose gelöst in 2xYT-Agar
2xYT-Agar ^{AMP/KAN}	100 µg/ml Ampicillin + 50 µg/ml Kanamycin gelöst in 2xYT-Agar
2xYT ^{AMP/GLU}	100 µg/ml Ampicillin + 1 % Glukose gelöst in 2xYT-Medium
2xYT ^{AMP/KAN}	100 µg/ml Ampicillin + 50 µg/ml Kanamycin gelöst in 2xYT-Medium
2xYT ^{AMP/KAN/IPTG}	100 µg/ml Ampicillin + 50 µg/ml Kanamycin + 0,25 mM IPTG gelöst in 2xYT-Medium
2xYT-Medium	7,75 g 2xYT Difco™ Medium gelöst in 250 ml aqua dest.
M9-Minimal-Medium-Agar	(A) 5,85 g Agar gelöst in 390 ml aqua dest. (B) 1,25 g NaCl + 2,5 g NH ₄ Cl + 16,95 g Na ₂ HPO ₄ + 7,5 g KH ₂ PO ₄ gelöst in 500 ml aqua dest. (C) 1 M MgSO ₄ gelöst in 100 ml aqua dest. (D) 1 M CaCl ₂ gelöst in 100 ml aqua dest. (E) 40 % Glukose gelöst in 100 ml aqua dest. (F) 1 mg Thiaminhydrochlorid gelöst in 10 ml aqua dest. Man mische jeweils 11,7 ml (A) + 3 ml (B) + 30 µl (C) + 1,5 µl (D) + 150 µl (E) + 6 µl (F) + 150 µl aqua dest. Die sterile Filtration der Komponenten (B) - (F) inkl. aqua dest. wird empfohlen.
SOC-Medium	2 % Pepton + 0,5 % Hefeextrakt + 10 mM NaCl + 2,5 mM KCl + 10 mM MgCl ₂ + 10 mM MgSO ₄ + 20 mM Glukose

6.2.10 Software

Bezeichnung	Verwendungszweck	Hersteller
Microsoft Office Paket 2017 bzw. 2019	Auswertungen allgemein	Microsoft
InCyte 2.7	Auswertung Guava-FACS	Merck Millipore
SP6800 Software	Auswertung SONY-FACS	SONY Biotechnology Inc.
LasergeneCoreSuite 14	Auswertungen von Sequenzen, Vektoranalysen, Primerdesign	DNASTAR Inc.
Numbers 5.1	Graphikdesign	Apple Inc.
Zotero 5.0.55	Literaturverarbeitungsprogramm	Projekt der "Corporation for Digital Scholarship" und des "Roy Rosenzweig Center for History and New Media"
Zen 2.3	Konfokalmikroskopie	Carl Zeiss AG
ChemoStar Touch v.0.5.38	Westernblot-Chemilumineszenzdetektor und -imager	Intas Science Imaging Instruments GmbH

6.2.11 Bakterienstämme

Bakterien	Beschreibung des Bakterienstammes	Hersteller
TG1	<i>F</i> '[traD36 lac ^f Δ(lacZ) M15 proA ⁺ B ⁺] glnV (supE) thi-1 Δ(mcrB-hsdSM)5 (r _K ⁻ m _K ⁻ McrB) thi Δ(lac- proAB)	Zymo Research
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' proAB lac ^f ZΔM15 Tn10 (Tet ^r)]	Agilent Technologies

6.2.12 Zelllinien

Zelllinie	Charakterisierung	Medium
DMS-273 (RRID No.: CVCL_1176)	Kleinzelliges Bronchialkarzinom (SCLC)	10 % FBS + 1 % P/S in Waymouth's

HEK293T (DSMZ No.: ACC 635)	Humane embryonale Nierenzellen	10 % FBS + 1 % P/S in RPMI
HCC-44 (DSMZ No.: ACC 534)	Nicht kleinzelliges Bronchialkarzinom (NSCLC)	10 % FBS + 1 % P/S in RPMI
Kasumi-1 (DSMZ No.: ACC 220)	Akute myeloische Leukämie, M2	20 % FBS in RPMI
Kasumi-3 (DSMZ No.: ACC 714)	Akute myeloische Leukämie, M0	20 % FBS + 1 % P/S in RPMI
KM-H2 (DMSZ No.: ACC 8)	Hodgkin-Lymphom	10 % FBS + 1 % P/S in RPMI
Nalm-6 (DSMZ No.: ACC 128)	Akute lymphatische Leukämie, B-Zell-Typ	10 % FBS + 1 % P/S in RPMI
RD-ES (DSMZ No.: ACC 260)	Ewing-Sarkom	10 % FBS + 1 % P/S in RPMI

Als Modellzelllinie für funktionelle Versuche wurde die in Suspension wachsende Kasumi-1 verwendet. Bei dichtem Bewuchs der Kulturflaschen wurde die Zellsuspension aus der Flasche entnommen, niedrig bei 1.300 rpm für 5 Min. abzentrifugiert und je nach geschätzter Zelldichte in Splitverhältnissen zwischen 1 : 2 bis 1 : 10 weiterkultiviert. Die Kultivierungszeit belief sich dabei auf maximal sechs Wochen, ehe eine niedrigere Passage für weitere funktionelle Versuche aufgetaut wurde. Die Kulturbedingungen betragen 37 °C bei 5 % CO₂-Begasung.

6.3 Kontrolle der immunmagnetischen Separation (MACS)

Im Rahmen der immunmagnetischen Separation wurden die Blasten der Patienten angereichert, indem sie nach CD34 über eine MACS-Säule aufgereinigt wurden (vgl. 2.6.7). Zur Überprüfung der Aufreinigung wurde eine FACS-Färbung angeschlossen. Hierbei wurde eine Isotypkontrolle mitgefärbt, welche als Kontrolle einer unspezifischen Adsorption des mit Fitc gekoppelten CD34-AKs verwendet wurde (vgl. 2.6.4.1).

Zur Veranschaulichung des Aufreinigungserfolges wurden die CD34+ Blasten vor MACS bzw. nach MACS (Positivselektion) miteinander verglichen.

Als Beispiel ist in Abbildung 30 eine MACS-Anreicherung des Patienten B gezeigt. Hier konnte eine Anreicherung von ehemals 36 % auf 95 % CD34+Blasten erzielt werden. Die zusätzlich getestete Waschfraktion diente überdies der Bestimmung des experimentellen Verlustes an Blasten. Dieser Betrag in diesem Beispiel anteilig 5 %.

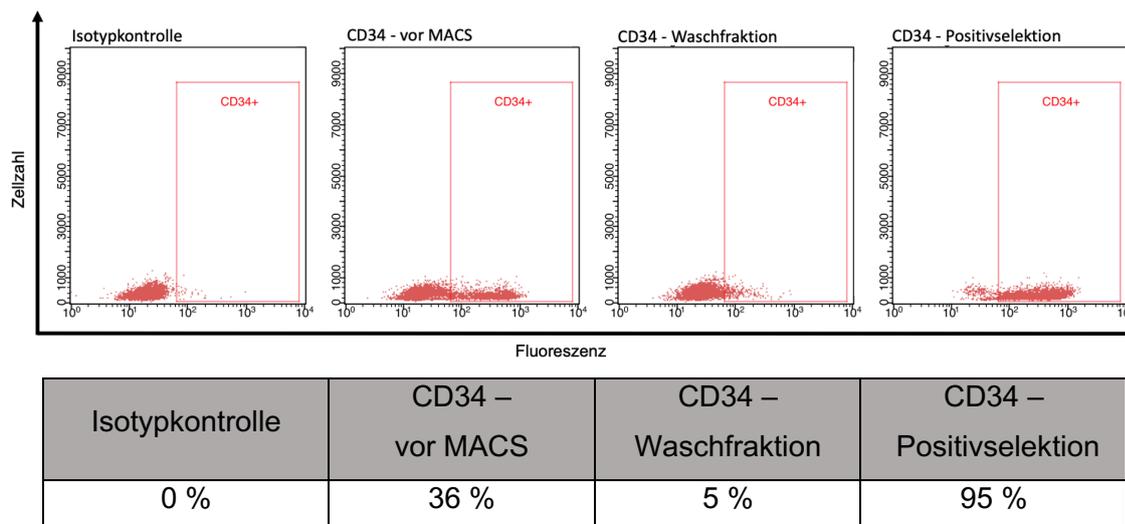


Abbildung 30: MACS-Kontrolle

Abgebildet ist die via FACS durchgeführte MACS-Kontrolle, hier beispielhaft dargestellt anhand der immunmagnetischen Separation des Patienten B im Zuge seiner ersten SR. Aufgetragen sind in allen Plots die Zellzahlen gegen die gemessenen Fluoreszenzen. Als Kontrolle diente die zum jeweiligen Fluorochrom passende Isotypkontrolle (vgl. 2.6.4.1). Bezüglich der Strategie zum Setzen des CD34-Gates sei auf 2.6.4.3 verwiesen. Innerhalb dieses Gates wurden nun anteilig die Blasten an den dargestellten Populationen bestimmt. Die unter jedem Plot abgebildete Spalte der dargestellten Tabelle gibt dabei den gemessenen CD34+ Anteil an Zellen im jeweiligen Plot an. Im zweiten dargestellten Plot ist dabei der CD34-Anteil vor MACS, im vierten Plot derjenige nach MACS abgebildet, welches die Anreicherung darstellt. Die Waschfraktion, welche im dritten Plot dargestellt ist, beschreibt hierbei den Verlust derjenigen Zellen, die potentiell noch hätten aufgereinigt werden können z.B. durch erneuten MACS der Zellen. – Abkürzungen: MACS – magnetic activated cell sorting;

6.4 Tabellarische Darstellungen der Output- / Input-Titer

Zur Vervollständigung sind die detaillierten Zahlenwerte der In- und Output-Titer sowie der aus ihnen resultierende Quotient angegeben, welche u.a. unter 3.5.1 bereits Erörterung fanden. Diese Titer wurden jeweils an den Tagen 4 und 5 des allgemeinen PD-Schemas bestimmt, indem die über Nacht gewachsenen Kolonien gezählt und anschließend die CFU/ml berechnet wurden (siehe 2.7.1.4).

Patient 0	1. SR	2. SR	3. SR
Input-Titer (CFU/ml)	$4,65 \cdot 10^{12}$	$21,5 \cdot 10^{12}$	$30,6 \cdot 10^{12}$
Output-Titer (CFU/ml)	$17,7 \cdot 10^6$	$7,05 \cdot 10^6$	$64 \cdot 10^6$
Output- / Input-Titer	$38,1 \cdot 10^{-7}$	$3,28 \cdot 10^{-7}$	$20,9 \cdot 10^{-7}$

Tabelle 18: Input- und Output-Titer Patient 0

Output- und Input-Titer sowie deren Verhältnisse zueinander sind jeweils zur besseren Vergleichbarkeit zwischen den Selektionsrunden mit denselben Exponenten je Titer dargestellt. Diese Exponentengleichheit wurde auch für alle folgenden Patienten beibehalten. Die Einheit für In- und Output-Titer ist hierbei CFU/ml, indessen das Verhältnis dieser beiden Titer einheitenlos ist. Patient 0 zeigte dabei einen sanduhrförmigen Anstieg dieser Titerquotienten, wie unter 3.5.1 erörtert wurde. – Abkürzungen: CFU – colony forming units

Patient A	1. SR	2. SR	3. SR
Input-Titer (CFU/ml)	$5 \cdot 10^{12}$	$27,95 \cdot 10^{12}$	$40 \cdot 10^{12}$
Output-Titer (CFU/ml)	$8,65 \cdot 10^6$	$2,75 \cdot 10^6$	$56,85 \cdot 10^6$
Output- / Input-Titer	$17,3 \cdot 10^{-7}$	$0,98 \cdot 10^{-7}$	$14,2 \cdot 10^{-7}$

Tabelle 19: Input- und Output-Titer Patient A

Auch hier wurde die Exponentengleichheit (siehe Tabelle 18) beibehalten. Patient A zeigte einen sanduhrartigen Anstieg des Output- / Input-Titers. Für weitere Erörterungen siehe Tabelle 18.

Patient B	1. SR	2. SR	3. SR
Input-Titer (CFU/ml)	$6,9 \cdot 10^{12}$	$17 \cdot 10^{12}$	$2,1 \cdot 10^{12}$
Output-Titer (CFU/ml)	$2,8 \cdot 10^6$	$0,85 \cdot 10^6$	$8,85 \cdot 10^6$
Output- / Input-Titer	$4,06 \cdot 10^{-7}$	$0,5 \cdot 10^{-7}$	$42 \cdot 10^{-7}$

Tabelle 20: Input- und Output-Titer Patient B

Es sind dieselben Aussagen wie zu Patient A zu treffen.

Patient C	1. SR	2. SR	3. SR
Input-Titer (CFU/ml)	$5,15 \cdot 10^{12}$	$9,75 \cdot 10^{12}$	$8,45 \cdot 10^{12}$
Output-Titer (CFU/ml)	$2,4 \cdot 10^6$	$0,2 \cdot 10^6$	$1,7 \cdot 10^6$
Output- / Input-Titer	$4,66 \cdot 10^{-7}$	$0,21 \cdot 10^{-7}$	$2,01 \cdot 10^{-7}$

Tabelle 21: Input- und Output-Titer Patient C

Es sind dieselben Aussagen wie zu Patient A zu treffen.

Patient D	1. SR	2. SR	3. SR
Input-Titer (CFU/ml)	$5,95 \cdot 10^{12}$	$26,15 \cdot 10^{12}$	$38,2 \cdot 10^{12}$
Output-Titer (CFU/ml)	$0,7 \cdot 10^6$	$6,25 \cdot 10^6$	$635 \cdot 10^6$
Output- / Input-Titer	$1,18 \cdot 10^{-7}$	$2,39 \cdot 10^{-7}$	$166 \cdot 10^{-7}$

Tabelle 22: Input- und Output-Titer Patient D

Anstelle eines sanduhrförmigen Anstiegs des Output- / Input-Titers ist ein rampenförmiger Anstieg, d.h. mit jeder Selektionsrunde stetig steiler, zu verzeichnen gewesen. Dieses findet gleichfalls unter 3.5.1 Erörterung. – Abkürzungen: CFU – colony forming units

6.5 Phagenbindung gemäß polyklonaler Analyse

6.5.1 Auswertung Patient 0

Wie unter 3.5.2 bereits dargelegt, konnte keine Anreicherung spezifischer Phagen während der PD-Strategie des Patienten 0 nachgewiesen werden. Zur

Vervollständigung der unter Abbildung 19 dargelegten polyklonalen Analysen der restlichen Patienten sei hier jene des Patienten 0 abgebildet.

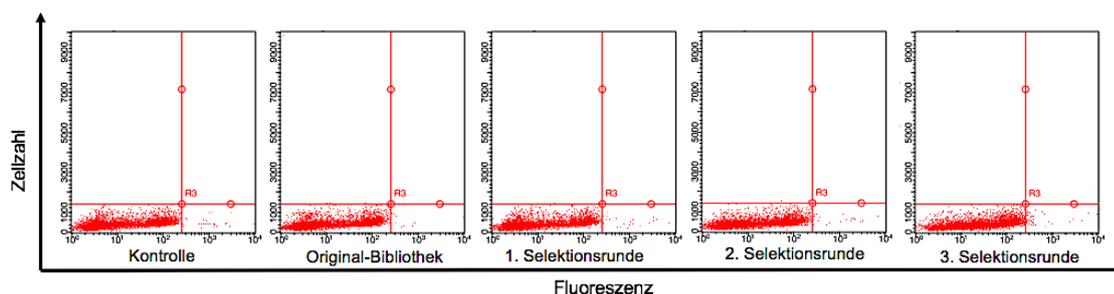


Abbildung 31: Polyklonale Analyse des Patienten 0

Zu sehen ist die Auswertung der polyklonalen Analyse des Patienten 0. Für eingehendere Erörterungen sei auf die Bildunterschrift zur Abbildung 19 verwiesen.

6.5.2 Tabellarische Übersicht aller Patienten

Zudem sei eine tabellarische Auswertung der der polyklonalen Analyse des Phagenpools eines jeden Patienten zur Hand gereicht (siehe Tabelle 23).

Patienten	Kontrolle	OB	1. SR	2. SR	3. SR	3. SR (%)
Patient 0	1	1,0	1,1	1,4	3,8	1,94
Patient A	1	1,0	1,0	10,2	157,0	83,2
Patient B	1	1,0	0,9	2,0	2,7	11,8
Patient C	1	1,0	1,1	1,1	8,9	41,0
Patient D	1	1,1	1,1	22,4	34,7	97,0

Tabelle 23: Auswertung der polyklonalen Analyse

Zur Auswertung der polyklonalen Analyse wurden die jeweiligen Messwerte in Relation zur Kontrolle gesetzt. Somit stellen die abgebildeten Zahlen bereits die x-fache Anreicherung dar. Alle Patienten bis auf Patient 0 konnte somit ein Anreicherungserfolg bescheinigt werden, da sie die beiden Auswertungskriterien (MFI-Anstieg gegenüber der unselektionierten Original-Bibliothek Tomlinson J (OB) um mehr als 75 %, sowie ein prozentual positiver Zellanteil von mehr als 10 %) erfüllten. Patient 0 scheiterte jedoch am prozentualen Anteil der 3. SR, hier rot hervorgehoben. Abkürzungen: OB – Original-Bibliothek; SR – Selektionsrunde

Hierbei wurden die gemessenen MFI der getesteten Zellen in Relation zu derjenigen MFI der jeweiligen Kontrolle gesetzt. Somit beschreiben die Werte der Tabelle die x-fache Anreicherung – im Sinne einer Zunahme der spezifischen Zellerkennung – während der SR. Auch hier wird ersichtlich, dass Patient 0 die unter 2.7.2.2 genannten Auswertungskriterien verfehlte, was zum Erliegen der Weiterverfolgung dieses Armes führte.

6.6 Phagenbindung gemäß Einzelphagenanalyse

6.6.1 Darstellung der Bindung auf Kasumi-1

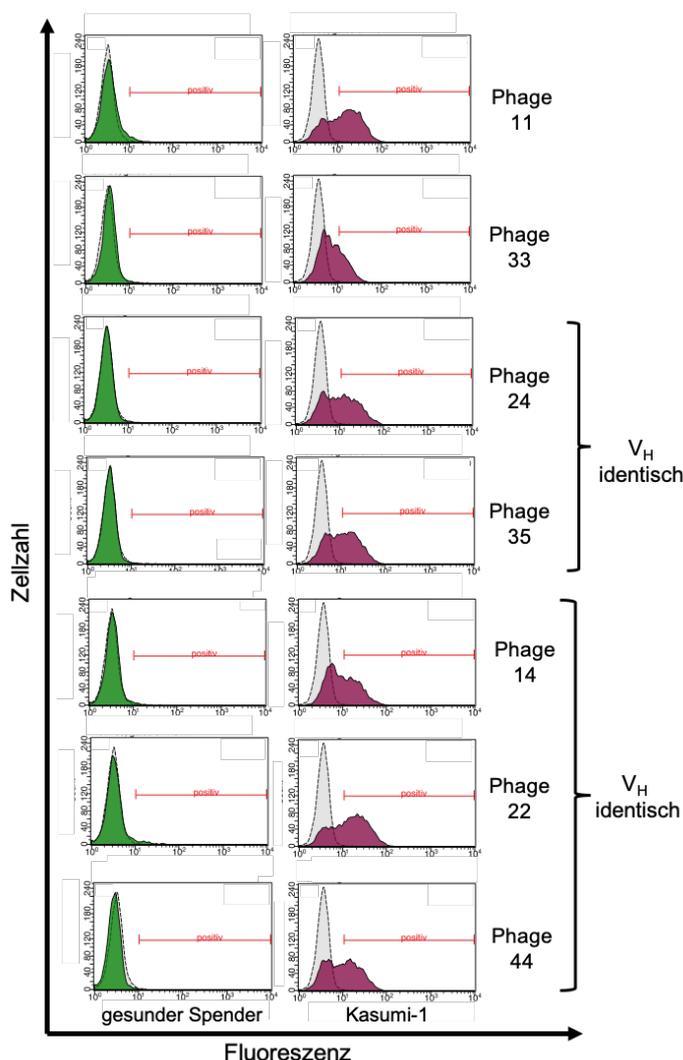


Abbildung 32: Auswertung der Einzelphagenanalyse auf Kasumi-1

Zu sehen ist die Vervollständigung der Einzelphagenanalyse der sieben vielversprechendsten Binder durch Testung auf der Zelllinie Kasumi-1 (aubergine) und auf Blutzellen eines gesunden Spenders (grün). Für weitere Beschreibungen der Plots sei auf die Bildunterschrift zur Abbildung 21 verwiesen.

Zur Vervollständigung der Auswertungen der Einzelphagenanalyse (siehe 3.5.4) ist die Analyse auf der Zelllinie Kasumi-1 im Vergleich zum mitgefärbten gesunden Spender dargestellt.

Auch diese Färbung zeigte keinerlei Bindung der gesunden Spender durch die Phagen, indessen alle sieben weiterverfolgten Phagen Kasumi-1-Zellen erkannten.

6.6.2 Tabellarische Auswertung aller Phagen

Im Folgenden sei zur Vervollständigung aller Einzelphagentestungen eine tabellarische Auswertung anhand der unter 2.7.4.1 dargestellten Kriterien mit passender unter 3.5.4 einzusehender Grafik abgebildet.

AK	11			14			22			24			33			35			44		
Kriterien	MFI	10%	Σ																		
Gesunder Spender	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kasumi-1	+++	++	+	++	+	+	+++	++	+	+++	+	+	+	+	+	+++	+	+	+++	+	+
Patient A	s	+++	+	+++	++	+	s	+++	+	++	+	+	s	+++	+	+++	++	+	+++	++	+
Patient B	+++	++	+	+++	++	+	s	++	+	+++	+	+	s	++	+	+++	++	+	+++	+	+
Patient C	+++	+	+	+++	+	+	s	+	+	+++	+	+	+++	+	+	+++	+	+	+++	+	+
Patient D	s	+++	+	+++	++	+	+++	++	+	+++	++	+	+++	+++	+	+++	++	+	++	+	+

Kriterium A (MFI)		Kriterium B (10 %)	
MFI-Anstieg um unter 75 %:	-	Unter 10 % der Zellen:	-
MFI-Anstieg um mind. 75 %:	+	Mind. 10 % der Zellen:	+
MFI-Anstieg um mind. 100 %:	++	Mind. 50 % der Zellen:	++
MFI-Anstieg um mind. 150 %:	+++	Mind. 75 % der Zellen:	+++
MFI-Anstieg um mind. 400 %:	s		

Tabelle 24: Auswertung der Einzelphagenanalyse

Abgebildet ist die tabellarische Einzelphagenauswertung, welche anhand der unterhalb der Tabelle gelisteten Kriterien A und B erfolgte. Nähere Erörterungen zum Auswertungsprozedere sind unter 2.7.4.1 beschrieben. Pro AK sind in vorliegender Tabelle drei Spalten zu finden, welche das Kriterium A (MFI – median fluorescence intensity), das Kriterium B (10 %) und letztlich die finale Bewertung (Σ, hellgelb hervorgehoben) enthalten. Eine finale positive (+) Bewertung eines Binders wurde nur vorgenommen, sofern beide Kriterien mit mind. „+“ erfüllt waren.

6.7 Basenabfolge / Aminosäuresequenz der scFv-Inserts nach Mutation

Die nachfolgend dargestellten Basenabfolgen wurden mit dem Programm CoreSuite Lasergene ausgelesen und erstellt. Abbgebildet sind alle Sequenzen der sieben vielversprechendsten scFv (Inserts) nach ortsspezifischer Mutagenese (siehe 2.8.5). Das Ambercodon ist daher bereits durch ein Glutamin (Q) ersetzt dargestellt.

```

5' CCGGCCATGGCCGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGG
o ++++++
1 P A M A E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y A M S W 120
5' GTCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGGTCTCAAGTATTCAGCATTTGGGTCGCGGACAGCTTACGACACTCCGTGAAGGGCCGGTTCAACATCTCCAGAGACAATCCAAG
o ++++++
1 V R Q A P G K G L E W V S S I Q H L G S R T A Y A D S V K G R F T I S R D N S K 240
5' AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTAAGTGTGCGAAACATGCGACGCTTTTACTACTGGGGCCAGGAAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC
o ++++++
1 N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K H A T S F D Y W G Q G T L V T V S S 360
5' GGTGGAGCGGTTTCAGGCGGAGTGGCAGCGGCGTGGCGGGTCGACGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAACATCACITGCCGG
o ++++++
1 G G G G S G G G G S G G G G S T D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R 480
5' GCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTTGGTATCAGCAGAAACAGGGAAAGCCCTTAAGCTCCTGATCTATAGGGCATCCATTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGC
o ++++++
1 A S Q S I S S Y L N W Y Q Q K P G K A P K L L I Y R A S I L Q S G V P S R F S G 600
5' AGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGAACCTTACTACTGTCAACAGTGGGCTATTGTGCCTCCGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTG
o ++++++
1 S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q W A I V P P T F G Q G T K V 720
5' GAAATCAAACGGGC
o ++++++
1 E I K R A
o

```

Abbildung 33: Basenabfolge und Aminosäuresequenz Insert 11

- Anhang -

```
5' CCGGCCATGGCCGAGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGG 120
1 |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
0 | P A M A E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y A M S W
5' GTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGGTCTCAACGATTACAGGGCGTGGTCATAGGACAGCGTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATCCAAG 240
1 |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
0 | V R Q A P G K G L E W V S T I Q G R G H R T A Y A D S V K G R F T I S R D N S K
5' AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTAAGTCTGCGAAATCGTCGCTTGTGTTTGAAGTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCAACGCTCGAGC 360
1 |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
0 | N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K S S L V F D Y W G Q G T L V T V S S
5' GGTGGAGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCAGCGCGGTGGCGGGTGCAGGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTACCATCACTTGCCGG 480
1 |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
0 | G G G G S G G G G S G G G G S T D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R
5' GCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATGGTATCAGCAGAAACAGGGAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATAGGGCATCCCGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTTCAGTGGC 600
1 |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
0 | A S Q S I S S Y L N W Y Q Q K P G K A P K L L I Y R A S R L Q S G V P S R F S G
5' AGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGAAGTACTACTGTCAACAGGCTCATACTGCTCCTAGTACGTTCCGGCAAGGACCAAGGTTG 720
1 |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
0 | S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q A H T A P S T F G Q G T K V
5' GAAATCAAACGGGCG
1 |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
0 | E I K R A
1
0
```

Abbildung 34: Basenabfolge und Aminosäuresequenz Insert 14

```
5' CCGGCCATGGCCGAGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGG 120
1 |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
0 | P A M A E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y A M S W
5' GTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGGTCTCAACGATTACAGGGCGTGGTCATAGGACAGCGTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATCCAAG 240
1 |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
0 | V R Q A P G K G L E W V S T I Q G R G H R T A Y A D S V K G R F T I S R D N S K
5' AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTAAGTCTGCGAAATCGTCGCTTGTGTTTGAAGTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCAACGCTCGAGC 360
1 |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
0 | N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K S S L V F D Y W G Q G T L V T V S S
5' GGTGGAGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCAGCGCGGTGGCGGGTGCAGGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTACCATCACTTGCCGG 480
1 |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
0 | G G G G S G G G G S G G G G S T D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R
5' GCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATGGTATCAGCAGAAACAGGGAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATATGATCCAGGTTGCAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTTCAGTGGC 600
1 |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
0 | A S Q S I S S Y L N W Y Q Q K P G K A P K L L I Y Y A S R L Q S G V P S R F S G
5' AGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGAAGTACTACTGTCAACAGTCTTCGCTGACTCCTGCGACGTTCCGGCAAGGACCAAGGTTG 720
1 |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
0 | S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q S S L T P A T F G Q G T K V
5' GAAATCAAACGGGCG
1 |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
0 | E I K R A
1
0
```

Abbildung 35: Basenabfolge und Aminosäuresequenz Insert 22

```
5' CCGGCCATGGCCGAGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGG 120
1 |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
0 | P A M A E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y A M S W
5' GTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGGTCTCAACTATTACTCAGCGGGTAGTAGTACAAGTTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATCCAAG 240
1 |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
0 | V R Q A P G K G L E W V S T I T Q R G S S T S Y A D S V K G R F T I S R D N S K
5' AACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTAAGTCTGCGAAAGGACGACGGTGTGTTTGAAGTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCAACGCTCGAGC 360
1 |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
0 | N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K G T T V F D Y W G Q G T L V T V S S
5' GGTGGAGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCAGCGCGGTGGCGGGTGCAGGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTACCATCACTTGCCGG 480
1 |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
0 | G G G G S G G G G S G G G G S T D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R
5' GCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATGGTATCAGCAGAAACAGGGAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATCGGGCATCCCGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTTCAGTGGC 600
1 |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
0 | A S Q S I S S Y L N W Y Q Q K P G K A P K L L I Y R A S A L Q S G V P S R F S G
5' AGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGAAGTACTACTGTCAACAGTATCAGACGGGGCCATGACGTTCCGGCAAGGACCAAGGTTG 720
1 |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
0 | S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y Q T G P M T F G Q G T K V
5' GAAATCAAACGGGCG
1 |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
0 | E I K R A
1
0
```

Abbildung 36: Basenabfolge und Aminosäuresequenz Insert 24

- Anhang -

```
5 CCGGCCATGGCCAGGTGCAGCTGTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGG 120
0 P A M A E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y A M S W
1
5 GTCCGCCAGGTCACAGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAACGATTTCAGAATCGTGGTACAGTACAGCGTACGAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCAGAGACAATCCAAG 240
0 V R Q A P G K G L E W V S T I Q N R G Q S T A Y A D S V K G R F T I S R D N S K
1
5 AACACGCTGTATCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAATCGGCTGCTCGTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTACCCTCTCGAGC 360
0 N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K S A A R F D Y W G Q G T L V T V S S
1
5 GGTGAGGCGGTTACAGGCGAGGTGGCAGCGCGGTGGCGGGTGCACGGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTACCATCACTTGCCCG 480
0 G G G G S G G G S G G G G S T D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R
1
5 GCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTAAATTTGGTATCAGCAGAAACAGGAAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATAATGCATCCTCTTTCCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGC 600
0 A S Q S I S S Y L N W Y Q Q K P G K A P K L L I Y N A S S L Q S G V P S R F S G
1
5 AGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGAACCTACTACTGTCAACAGCCGATACGTCGCCCTTTACGTTCCGGCCAAAGGACCAAGTGG 720
0 S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q P H T S P F T F G Q G T K V
1
5 GAAATCAAACGGGC
0 ++++++
1 E I K R A
~
```

Abbildung 37: Basenabfolge und Aminosäuresequenz Insert 33

```
5 CCGGCCATGGCCAGGTGCAGCTGTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGG 120
0 P A M A E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y A M S W
1
5 GTCCGCCAGGTCACAGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAACTATTACTCAGCGGGTAGTAGTACAAGTTACGAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCAGAGACAATCCAAG 240
0 V R Q A P G K G L E W V S T I T Q R G S S T S Y A D S V K G R F T I S R D N S K
1
5 AACACGCTGTATCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGGACGACGGTTTTTGGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTACCCTCTCGAGC 360
0 N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K G T T V F D Y W G Q G T L V T V S S
1
5 GGTGAGGCGGTTACAGGCGAGGTGGCAGCGCGGTGGCGGGTGCACGGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTACCATCACTTGCCCG 480
0 G G G G S G G G S G G G G S T D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R
1
5 GCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTAAATTTGGTATCAGCAGAAACAGGAAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATAATGCATCCTCTTTCCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGC 600
0 A S Q S I S S Y L N W Y Q Q K P G K A P K L L I Y R A S T L Q S G V P S R F S G
1
5 AGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGAACCTACTACTGTCAACAGAAATGCTTGGCGCCATGACGTTCCGGCCAAAGGACCAAGTGG 720
0 S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q N A L A P M T F G Q G T K V
1
5 GAAATCAAACGGGC
0 ++++++
1 E I K R A
~
```

Abbildung 38: Basenabfolge und Aminosäuresequenz Insert 35

```
5 CCGGCCATGGCCAGGTGCAGCTGTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGG 120
0 P A M A E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y A M S W
1
5 GTCCGCCAGGTCACAGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAACGATTCAGGGCGGTGGTCATAGGACAGCGTACGAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCAGAGACAATCCAAG 240
0 V R Q A P G K G L E W V S T I Q G R G H R T A Y A D S V K G R F T I S R D N S K
1
5 AACACGCTGTATCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAATCGTGGCTGTGTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTACCCTCTCGAGC 360
0 N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K S S L V F D Y W G Q G T L V T V S S
1
5 GTTGGAGGCGGTTACAGGCGAGGTGGCAGCGCGGTGGCGGGTGCACGGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTACCATCACTTGCCCG 480
0 G G G G S G G G S G G G G S T D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R
1
5 GCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTAAATTTGGTATCAGCAGAAACAGGAAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATAATGCATCCTCTTTCCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGC 600
0 A S Q S I S S Y L N W Y Q Q K P G K A P K L L I Y A A S S L Q S G V P S R F S G
1
5 AGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGAACCTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCTAATACGTTCCGGCCAAAGGACCAAGTGG 720
0 S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q S Y S T P N T F G Q G T K V
1
5 GAAATCAAACGGGC
0 ++++++
1 E I K R A
~
```

Abbildung 39: Basenabfolge und Aminosäuresequenz Insert 44

6.8 Aminosäuresequenzen der scFv-Fc

Nachfolgende Aminosäuresequenzen der scFv-Fc wurden anhand der Website <http://web.expasy.org/translate/> aus den DNA-Basenabfolgen nach Sequenzierung (siehe 2.8.4) erstellt. Die in den pMS2-Vektor klonierten scFv-Inserts sind rot dargestellt.

AK 11

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDAAQ**PAMAEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT**
FSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIQLHLSRTAYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN
SLRAEDTAVYYCAKHATSFYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSTDIQMTQS
PSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYRASILQSGVPSRFSGS
GSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQAIVPPTFGQGTKVEIKRAAAELPPLKECPPCA
APDLLGGPSVFIFPPKIKDVLMI S LSPMVT CVVVDVSEDDPDVQISWVNNVEVHTAQT
QTHREDYNSTLRVVSALPIQH QDWMSGKEFKCKVNNRALPSPIEKTISKPRGPVRAP
QVYVLPPPAEEMTKKEFSLTCMITGFLPAEIAVDWTSNGRTEQNYKNTATVLDSDGSY
FMYSKLRVQKSTWERGSLFACSVVHEGLHNHLTTKTISRSLGKRRAAWSH PQFEKSR
AEHEFRGGPEQKLISEEDLNSAVDHHHHHH

AK 14

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDAAQ**PAMAEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT**
FSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSTIQGRGHRTAYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN
SLRAEDTAVYYCAKSSLVFDYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSTDIQMTQS
PSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYASRLQSGVPSRFSGS
GSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQAHTAPSTFGQGTKVEIKRAAAELPPLKECPPCA
APDLLGGPSVFIFPPKIKDVLMI S LSPMVT CVVVDVSEDDPDVQISWVNNVEVHTAQT
QTHREDYNSTLRVVSALPIQH QDWMSGKEFKCKVNNRALPSPIEKTISKPRGPVRAP
QVYVLPPPAEEMTKKEFSLTCMITGFLPAEIAVDWTSNGRTEQNYKNTATVLDSDGSY
FMYSKLRVQKSTWERGSLFACSVVHEGLHNHLTTKTISRSLGKRRAAWSH PQFEKSR
AEHEFRGGPEQKLISEEDLNSAVDHHHHHH

AK 22

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDAAQ**PAMAEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT**
FSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSTIQGRGHRTAYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN
SLRAEDTAVYYCAKSSLVFDYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSTDIQMTQS
PSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYASRLQSGVPSRFSGS
GSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQSSLTPATFGQGTKVEIKRAAAELPPLKECPPCA
APDLLGGPSVFIFPPKIKDVLMI S LSPMVT CVVVDVSEDDPDVQISWVNNVEVHTAQT
QTHREDYNSTLRVVSALPIQH QDWMSGKEFKCKVNNRALPSPIEKTISKPRGPVRAP
QVYVLPPPAEEMTKKEFSLTCMITGFLPAEIAVDWTSNGRTEQNYKNTATVLDSDGSY
FMYSKLRVQKSTWERGSLFACSVVHEGLHNHLTTKTISRSLGKRRAAWSH PQFEKSR
AEHEFRGGPEQKLISEEDLNSAVDHHHHHH

AK 24

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDAAQ**PAMAEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT**
FSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSTITQRGSSTSYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN
SLRAEDTAVYYCAKGTTVFDYWGGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSTDIQMTQS
PSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYRASALQSGVPSRFSGS
GGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYQTGPMTFGQGTKVEIKRAAAELPPLKECPPCA
APDLLGGPSVFIFPPKIKDVLMI S LSPMVT CVVVDVSEDDPDVQISWVNNVEVHTAQT
QTHREDYNSTLRVVSALPIQH QDWMSGKEFKCKVNNRALPSPIEKTISKPRGPVRAP
QVYVLPPPAEEMTKKEFSLTCMITGFLPAEIAVDWTSNGRTEQNYKNTATVLDSGSY
FMYSKLRVQKSTWERGSLFACSVVHEGLHNHLTTKTISRSLGKRRAAWSH PQFEKSR
AEHEFRGGPEQKLISEEDLNSAVDHHHHHH

AK 33

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDAAQ**PAMAEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT**
FSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSTIQNRGQSTAYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN
SLRAEDTAVYYCAKSAARFDYWGGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSTDIQMTQS
PSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYNASSLQSGVPSRFSGS
GGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQPHTSPFTFGQGTKVEIKRAAAELPPLKECPPCA
APDLLGGPSVFIFPPKIKDVLMI S LSPMVT CVVVDVSEDDPDVQISWVNNVEVHTAQT
QTHREDYNSTLRVVSALPIQH QDWMSGKEFKCKVNNRALPSPIEKTISKPRGPVRAP
QVYVLPPPAEEMTKKEFSLTCMITGFLPAEIAVDWTSNGRTEQNYKNTATVLDSGSY
FMYSKLRVQKSTWERGSLFACSVVHEGLHNHLTTKTISRSLGKRRAAWSH PQFEKSR
AEHEFRGGPEQKLISEEDLNSAVDHHHHHH

AK 35

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDAAQ**PAMAEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT**
FSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSTITQRGSSTSYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN
SLRAEDTAVYYCAKGTTVFDYWGGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSTDIQMTQS
PSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYRASTLQSGVPSRFSGS
GGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQNALAPMTFGQGTKVEIKRAAAELPPLKECPPCA
APDLLGGPSVFIFPPKIKDVLMI S LSPMVT CVVVDVSEDDPDVQISWVNNVEVHTAQT
QTHREDYNSTLRVVSALPIQH QDWMSGKEFKCKVNNRALPSPIEKTISKPRGPVRAP
QVYVLPPPAEEMTKKEFSLTCMITGFLPAEIAVDWTSNGRTEQNYKNTATVLDSGSY
FMYSKLRVQKSTWERGSLFACSVVHEGLHNHLTTKTISRSLGKRRAAWSH PQFEKSR
AEHEFRGGPEQKLISEEDLNSAVDHHHHHH

AK 44

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDAAQ**PAMAEVQLLES**GGGLVQ**PGGSLRLSCAASGFT**
FSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSTIQGRGHRTAYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN
SLRAEDTAVYYCAKSSLVFDYWGQGTLTV**VSSGGGGSGGGGSGGGG**STDIQ**MTQS**
PSSLSASVGDRV**TITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGS**
GSGT**DFTLTISSLPEDFATYYCQ**QSY**STPNTFGQGTKVEIKRAA**ELPPLKECPPCA
APDLLGGPSVFIFPPKIKDVL**MISLSPMVT**CV**VVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQT**
QTHREDYN**STLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNRALPSPIEKTISKPRGPVRAP**
QVYV**LPPPAEEMTKKEFSLTCMITGFLPAEIAVDWTSNGRTEQNYKNTATVLDSDGSY**
FMYSK**LRVQKSTW**ERGSLFACSV**VHEGLHNHLTTKTISRSLGKRRAAW**SH**PQFEKSR**
AEHEFRGGPEQKLISEEDLNSAVDHHHHHH

6.9 Immobilisierte Metallchelataffinitätschromatographie: His-Tag-Aufreinigung

Alle scFv-Fc besaßen einen aus sechs Histidinen bestehenden His-Tag an der C-terminalen Domäne (vgl. 2.4.2). Zur Aufreinigung der scFv-Fc konnte daher eine immobilisierte Metallchelataffinitätschromatographie (IMAC) durch Ni-NTA-(nickel-nitrilotriacetic acid-)Säulen durchgeführt werden.

Die Aminosäure Histidin des His-Tags zeigte hierbei starke Wechselwirkung mit immobilisierten Metallionen wie beispielsweise Nickel, so dass die mit Histidin getaggen scFv-Fc in der Säule zurückgehalten werden konnten (ten Haaf 2015). Die Immobilisation der Metallionen erfolgte wiederum über eine spezielle Matrix, im vorliegenden Fall NTA (Nitrilotriessigsäure) (ten Haaf 2015) (Priestersbach et al. 2015). Die Elution der scFv-Fc von den Ni-NTA-Säulen erfolgte durch Zugabe eines stark imidazolhaltigen Puffers. Das darin befindliche Imidazol, ein Abkömmling des Histidins, konkurrierte hierbei um die Bindung an der Ni-NTA-Säule mit den bereits gebundenen His-Tags (Bornhorst und Falke 2000). Somit fand eine kompetitive Verdrängung der Proteine statt. Das Eluat enthielt demgemäß die aufgereinigte Population an scFv-Fc. In vorliegender Arbeit wurde stets als Ausgangsmaterial für die IMAC HEK-Überstand verwendet, welcher die His-Tag-haltigen scFv-Fc enthielt. Zudem wurden die Ni-NTA Superflow-Säulen von Qiagen verwendet.

Zunächst wurde die Säule mit 10 ml Equilibrierungspuffer (10 mM Imidazol enthaltend) equilibriert, wobei anschließend 20 ml HEK-Überstand (Verwendung für Massenspektrometrie der AK 11, 22, 24 und 35, siehe 6.13) separat auf die Säulen gegeben wurde. Es folgten 10 ml Waschpuffer (20 mM Imidazol enthaltend) sowie 9 ml Elutionspuffer (250 mM Imidazol enthaltend), wobei letzteres Eluat aufgefangen wurde. Die Flussgeschwindigkeit all dieser Schritte sollte hierbei während des Durchdrückens durch die Säule bei circa 1ml pro Minute liegen. Die dabei aufgereinigte Proteinfraction

im Eluat wurde anschließend mittels Viva-Spin-Turbo-Konzentratoren eingengt und in PBS umgepuffert (siehe 6.10).

Zur Regeneration der Ni-NTA-Säulen wurden diese letztlich mit 15 ml 0,5 M NaOH gewaschen, wobei die Flussgeschwindigkeit bei 0,5 ml pro Minute lag. Nachfolgend wurden die Säulen noch durch eine Waschung mit 5 ml 20 %-igem Ethanol bei Geschwindigkeiten von bis zu 1ml pro Minute zur Lagerung vorbereitet.

6.10 Einengen und Umpufferung der scFv-Fc

Zur Einengung und Umpufferung der über His-Tag aufgereinigten scFv-Fc im Eluat der IMAC (siehe 6.9) wurde nachfolgend eine Zentrifugation via Viva-Spin-Turbo-Konzentratoren durchgeführt.

Diese Viva-Spins enthielten eine Membran, welche für Moleküle unter 30 kDa Masse durchlässig war (ten Haaf 2015). Hierdurch konnten alle kleinmolekularen Anteile entfernt, die scFv-Fc im Eluat jedoch behalten werden (ten Haaf 2015). Durch starke Zentrifugation mit gleichzeitigem Einschränken der Volumina auf unter 1 ml konnte so eine weitere Konzentration (= Einengung) erreicht werden.

Hierfür wurden die Konzentratoren zunächst mit 5 ml PBS vorgewaschen und bei 4.000 g und 4 °C für 3 Min. zentrifugiert. Anschließend wurden 9 ml Eluat der NiNTA-Aufreinigung hinzugefügt und solange gleichfalls bei 4.000 g und 4 °C zentrifugiert, bis Volumina unter 1 ml erreicht waren.

Danach erfolgte eine Umpufferung in PBS. Hierzu wurden drei Mal je 5 ml PBS zu den Restvolumina hinzugefügt und jedes Mal erneut auf das vorher vorhandene Volumen abzentrifugiert. Auch diese Umpufferung erfolgte bei 4.000 g und 4 °C.

6.11 Überprüfung der His-Tag-Aufreinigung und Einengung

Zur Überprüfung der His-Tag-Aufreinigung und der nachfolgenden Einengung wurde eine SDS-PAGE (siehe 2.9.1) durchgeführt. Hierfür wurde der NuPAGE® MES SDS Running Buffer (20X) bei einem NuPAGE® 4 – 12 % Bis-Tris-Gel verwendet.

Aufgetragen wurden zur Kontrolle der Größenmarker CM sowie die AK 11, 22, 24 und 35 je vor (v) und nach (n) His-Tag-Aufreinigung sowie Umpufferung in PBS.

6.11.1 Ergebnis

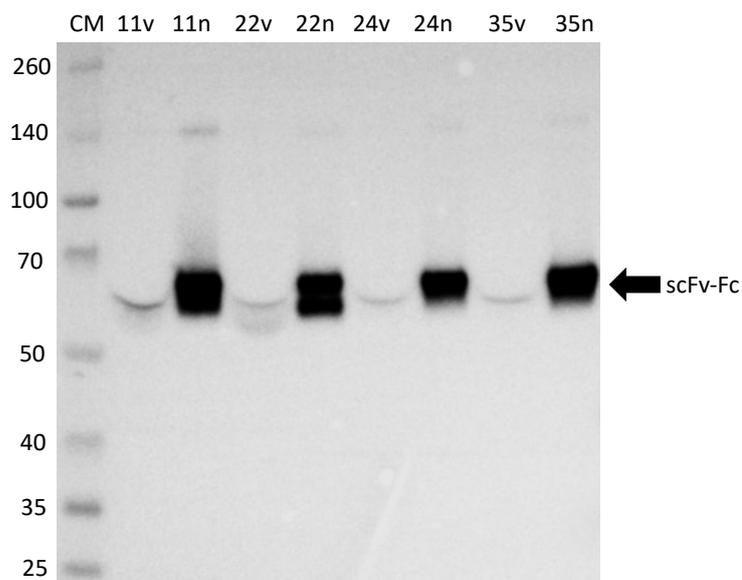


Abbildung 40: Westernblot der His-Tag-Aufreinigung

Dargestellt ist die über Ni-NTA-Säulen durchgeführte Aufreinigung der AK 11, 22, 24 und 35. Zur Versicherung der erfolgreichen Aufreinigung und Einengung wurden jeweils Proben der unaufgereinigten AK (v) und der aufgereinigten AK (n) aufgetragen. Anhand des Molekulargewichtsmarkers (CM) konnte final die errechnete und korrekte Größe der AK abgelesen werden. Abkürzungen: v – vor Aufreinigung; n – nach Aufreinigung; CM – Molekulargewichtsmarker, Angaben in linker Spalte in Kilodalton (kDa);

Im dargestellten Gel wird anhand der Bandendicke die erfolgreiche Aufreinigung im Vergleich der Banden vor (v) und nach (n) der jeweiligen Konzentrierung ersichtlich. Anhand des Größenmarkers lassen sich ebenso die erwarteten Größen der scFv-Fc von 59 kDa ablesen.

6.12 Coomassie-Färbung

Zur weiteren proteinbiochemischen Analyse der His-Tag-aufgereinigten und umgepufferten Antikörper sollten diese zur massenspektrometrischen Bestimmung geschickt werden. Hierbei wurde von der durchführenden AG Lochnit eine nach der SDS-PAGE über Coomassie angefärbte Probe befürwortet. Coomassie stellte hierbei ein Farbstoff dar, welcher in einem Polyacrylamidgel basische Proteinseitenketten anzufärben vermag, wodurch selbige Proteine sichtbar wurden (ten Haaf 2015).

Verwendet wurde ein Bolt™ 8 % Bis-Tris Plus Gel inkl. NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (20X) wie unter 2.9.1 beschrieben. Es wurden hierbei die AK 11, 22, 24 und 35 verwendet.

Dieses Gel wurde schließlich unter ständigem Schwenken für 30 Min. in die Coomassie-Lösung gelegt und nachfolgend mittels VE-Wasser gewaschen. Hierfür wurden außerdem zur Aufnahme des durch die Waschung abgegebene Farbstoffs Filterpapiere

hinzugefügt und das Gel damit bedeckt. Filterpapiere inklusive VE-Wasser wurden zunächst alle 2 h gewechselt, ehe sich eine letzte Waschung über Nacht anschloss.

6.12.1 Ergebnis

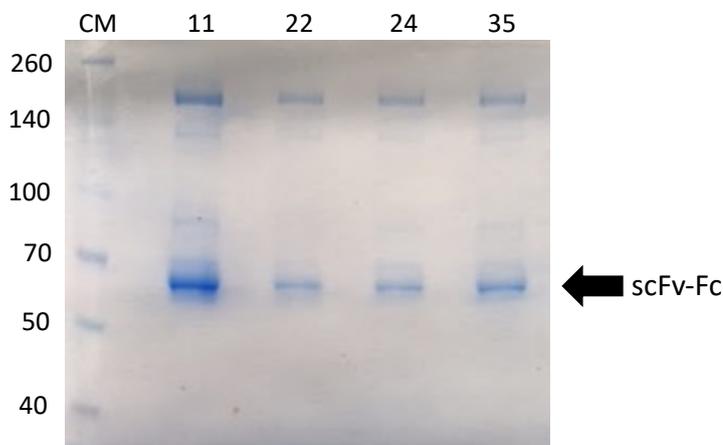


Abbildung 41: Coomassie-Färbung für die Massenspektrometrie

Dargestellt ist ein durch Coomassie gefärbtes Gel, aus welchem die dargestellten scFv-Fc-Banden ausgeschnitten und zur Überprüfung ihrer Aminosäuresequenz der Massenspektrometrie überantwortet wurden. Die Färbung wurde mit dem His-Tag-aufgereinigten scFv-Fc angefertigt. Abkürzungen: CM – Molekulargewichtsmarker, Angaben in linker Spalte in Kilodalton (kDa);

Im abgebildeten Gel lassen sich die mit Coomassie gefärbten und über Nacht gewaschenen Banden der AK 11, 22, 24 und 35 erkennen (siehe Abbildung 41). Diese wurden nachfolgend via Skalpell ausgeschnitten und der AG Lochnit zur massenspektrometrischen Überprüfung übersandt.

6.13 Massenspektrometrie

Zum weiteren Nachweis der korrekten Aminosäuresequenz des Proteins der scFv-Fc sollte die Massenspektrometrie in Anspruch genommen werden. Bei dieser Methode wird der Analyt fragmentiert, ionisiert und nachfolgend getrennt nach Masse und Ladung detektiert, welches in Form eines Massenspektrums abgebildet wird (Rehm und Letzel 2016). Anhand dieses Massenspektrums können letztlich Rückschlüsse auf den Analyten, z.B. dessen Zusammensetzung, gezogen werden (Budzikiewicz und Schäfer 2012).

Zur Ermöglichung einer Detektion im Massenspektrometer wurde zuvor eine NiNTA-Aufreinigung (siehe 6.9) durchgeführt. Nach erfolgter Aufreinigung wurde, wie unter 6.11 beschrieben, eine SDS-PAGE inklusive Blotting angefertigt, um den Aufreinigungserfolg zu demonstrieren (siehe Abbildung 40).

Gleichzeitig wurde eine weitere Gelaufftrennung des aufgereinigten Produktes erstellt, dieses Gel via Coomassie (vgl. 6.12) gefärbt und der AG Lochnit des Biochemischen Instituts in Gießen zur massenspektrometrischen Untersuchung überantwortet.

6.13.1 Ergebnis

Nachfolgend ist beispielhaft ein Massenspektrum - hier des AK 11 - dargestellt, so wie es auch für die AK 22, 24 und 35 durch die AG Lochnit mit bestem Dank angefertigt wurde (Abbildung 42). Wie diese Abbildung exemplarisch zeigt, konnten für alle getesteten scFv-Fc (AK 11, 22, 24 und 35) Peptidfragmente im Massenspektrum detektiert werden. Hierbei bewegte sich die Sequence Coverage, d.h. die prozentuale Abdeckung der gesuchten Proteinsequenz durch Sequenzpeaks im Massenspektrometer, zwischen 30,5 % und 44,5 %. Es konnten alle AK in ihrer Aminosäuresequenz erfolgreich nachgewiesen werden.

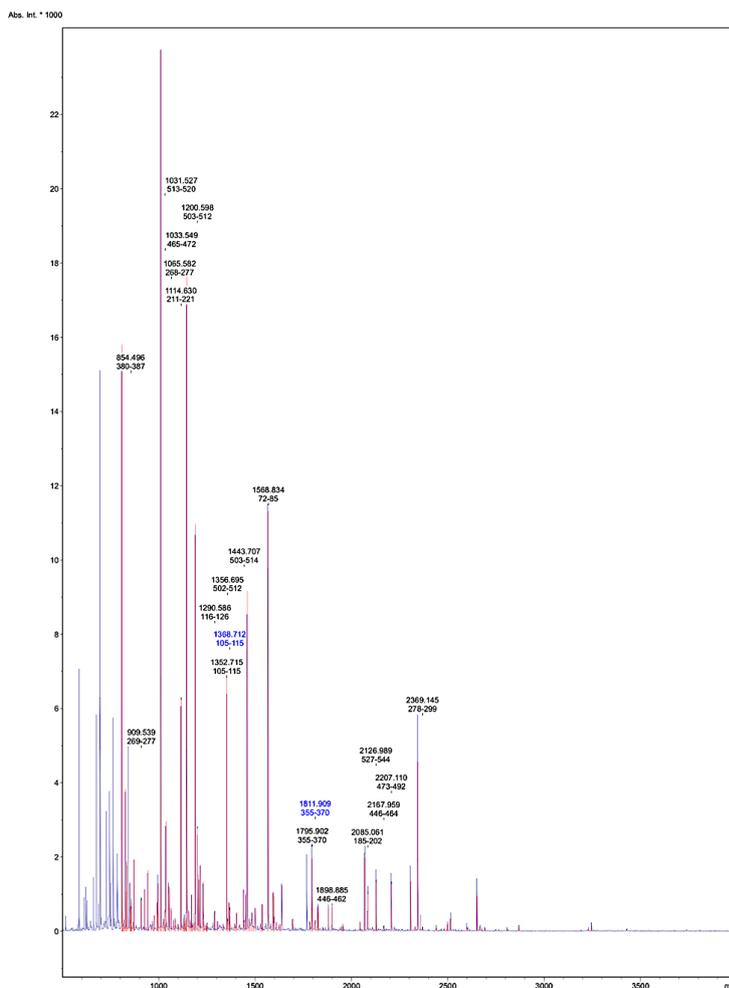


Abbildung 42: Massenspektrum des AK 11

Beispielhaft ist das Massenspektrum des AK 11 dargestellt. Die einzelnen Peaks zeigen detektierte Peptidfragmente an, wobei sie auf der Abszisse gegen ihre Masse-Ladungsverhältnisse (m/z) aufgetragen wurden. Die Ordinate gibt indessen die Intensität des Messsignals wieder. Die Detektionsrate, sog. Sequence Coverage der Massenspektrometrie, betrug bei abgebildetem Spektrum 37,7 %.

6.14 Trypsinierung

6.14.1 Abnahme der Fluoreszenz mit Dauer der Inkubationszeit

Ziel des durchgeführten Trypsinierungsversuches war es, das potentielle Antigen näher einzugrenzen und abschätzen zu können, ob ein Membranprotein oder z.B. ein Lipid der Membran das potentielle Target darstellte. Da Trypsin Proteine spaltet, wurde postuliert, dass ein Rückgang der Fluoreszenz zu verzeichnen wäre, wenn man eine Inkubation mit Trypsin über mehrere Stunden mit einem Placebo, hier PBS, verglich, sofern das gesuchte Antigen ein trypsinsensitives Protein wäre.

Wie in 3.9.2 bereits gezeigt, war ein Rückgang der Fluoreszenz durch Trypsinverdau zu beobachten, wenn man die Werte eines Trypsinverdau mit einer gleichlangen Inkubation mit normalem PBS verglich. Somit kann bei allen AK von einem trypsinsensiblen Protein als Target ausgegangen werden.

Zur Vervollständigung wird nachfolgend der Fluoreszenzrückgang dargestellt, welcher durch eine längere Inkubationsdauer mit Trypsin zu verzeichnen war. Da mit längerer Inkubation Trypsin einwirken und somit mehr Proteine von der Zelloberfläche eradizieren kann, ist auch die hier zu sehende Fluoreszenzverminderung ein Hinweis für ein trypsinsensibles Membranprotein als Zielantigen der AK.

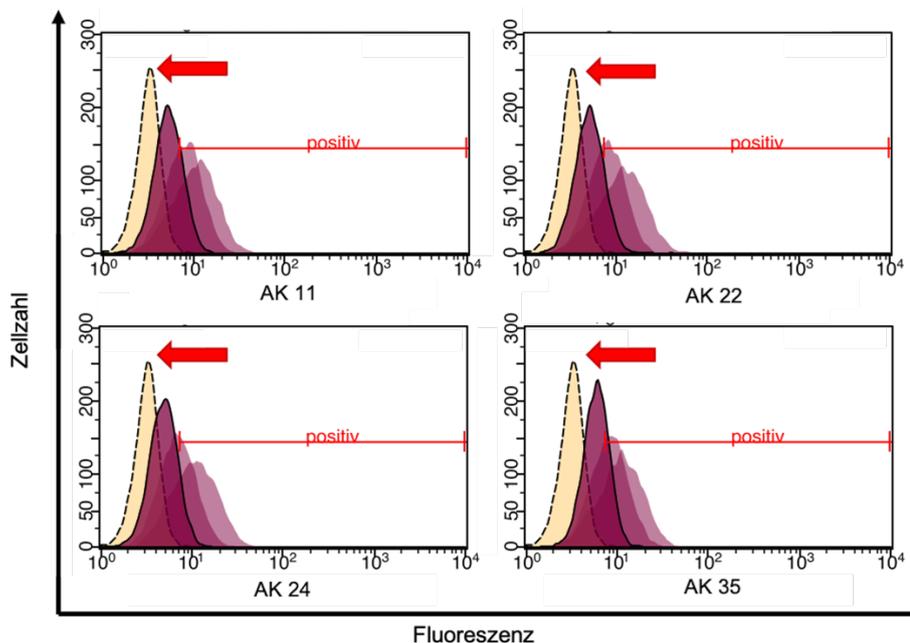


Abbildung 43: Trypsinierungsintervalle der AK 11, 22, 24 und 35

Abgebildet sind zur Vervollständigung der unter Abbildung 25 dargestellten Trypsinierungsansätze diejenigen Versuche, welche unterschiedliche Expositionszeiten gegenüber Trypsin zeigten. So ist ein Rückgang der Fluoreszenzen mit längerer Trypsininkubationsdauer zu verzeichnen, so dass beinahe der Wert der Kontrolle (gelb hinterlegt) erreicht wird. Die Abstopzeitpunkte der Inkubation in Trypsin beliefen sich dabei auf 15 Min., 30 Min., 1 h und 4 h. Diese Werte sind in den dargestellten Histogrammen in Aubergine dargestellt, wobei mit steigender Inkubationszeit der weiter links befindliche Peak entstanden war (entsprechend der Verlaufsrichtung der roten Pfeile). Für weitere Diagrammbeschreibungen sei auf die Bildunterschrift zu Abbildung 25 verwiesen.

6.15 Konfokalmikroskopie

6.15.1 Internalisierung in Kasumi-1

Zur Vervollständigung des unter 3.10.1 dargestellten Internalisierungsversuches, bei welchem bereits die Ergebnisse der AK 22 und 35 gezeigt wurden, sei an dieser Stelle die Internalisierung der AK 11 und 24 nachgereicht. Für weitere Beschreibungen des gesamten Versuchsansatzes sei auf die Darstellungen unter 2.11.1 verwiesen.

Als Ergebnis lässt sich auch bei diesen beiden nun dargestellten AK eine erfolgreiche Internalisierung verzeichnen, welche durch die Verminderung der Fluoreszenz vom 0 h-Wert zum 4 h-Wert offensichtlich wird.

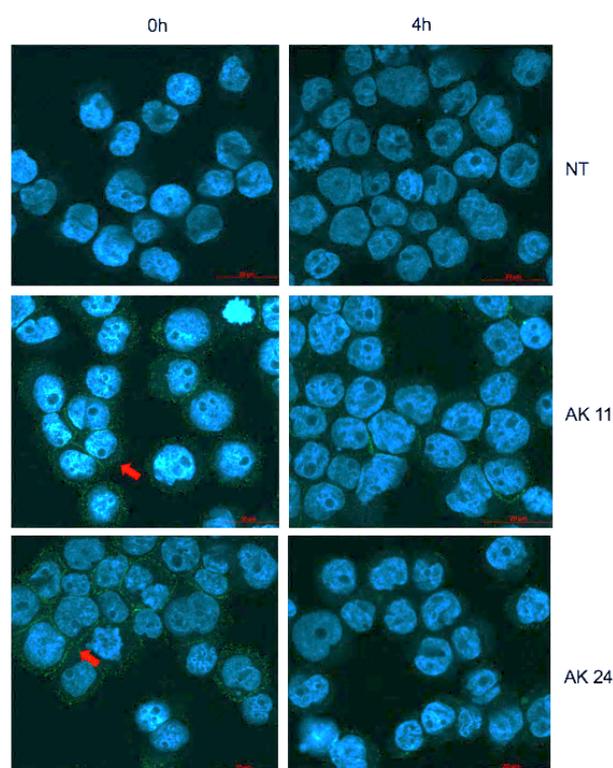


Abbildung 44: Konfokalmikroskopie der Internalisierung von AK 11 und 24

Äquivalent zu den unter Abbildung 27 beschriebenen Ergebnissen der AK 22 und 35 sind an dieser Stelle die Internalisierungsansätze der AK 11 und 24 nach 0- und 4-stündiger Inkubation bei 37 °C dargestellt. Die linke Spalte zeigt hierbei den 0 h-Wert zu Beginn der Internalisierung und die rechte Spalte den 4 h-Wert nach Internalisierung. Auch hier diente als Negativkontrolle eine Färbung mit nicht transfiziertem HEK-Überstand (NT). – Eine Verminderung der grünen Fluoreszenz der Zellmembranen (rote Pfeile) zwischen dem 0 h- und dem 4 h-Wert ist dabei zu verzeichnen. Größenmarker: 20 µm;

6.15.2 Bindung auf AML-Primärzellen

Wie unter 3.10.2 bereits ausgeführt, konnte auch im Rahmen der Konfokalmikroskopie eine Bindung der selektierten AK auf den jeweiligen AML-Primärzellen, welche den jeweiligen AK ursprünglich als Selektionszellen dienten, nachgewiesen werden. Nachfolgend seien daher die Bindungen der AK 22, 24 und 35 auf Patient B und jene des AK 35 auf Patient A dargestellt.

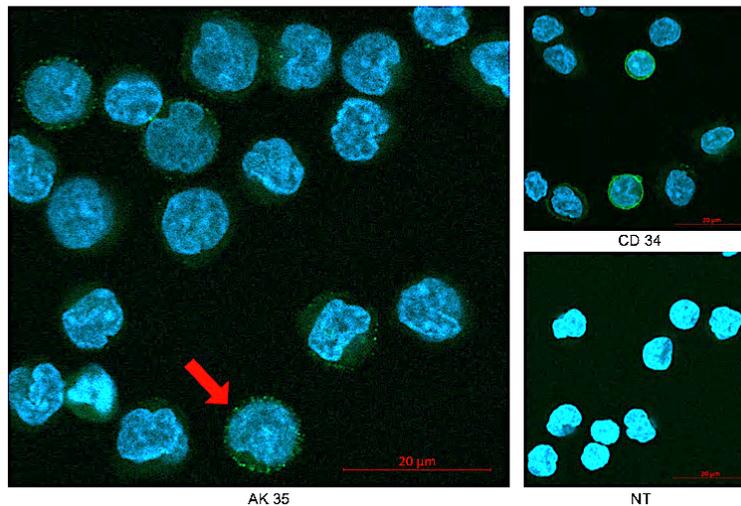


Abbildung 45: Konfokalmikroskopie des Patienten A

Dargestellt ist die Färbung des Patienten A mit dem auf ihm selektionierten AK 35. Da dieser AK zusätzlich auch auf Patient B selektioniert wurde, ist seine Färbung auf Patient B in Abbildung 46 gleichfalls einzusehen. Wie links im Bild zu sehen, kann eine Anfärbung der Zellmembranen nachgewiesen werden (roter Pfeil). Als Positivkontrolle diente hierbei eine Färbung mit dem Blastenmarker CD34 (oben rechts). Als Negativkontrolle wurde eine Färbung mit nicht transfiziertem HEK-Überstand (NT) durchgeführt. Größenmarker: 20 µm;

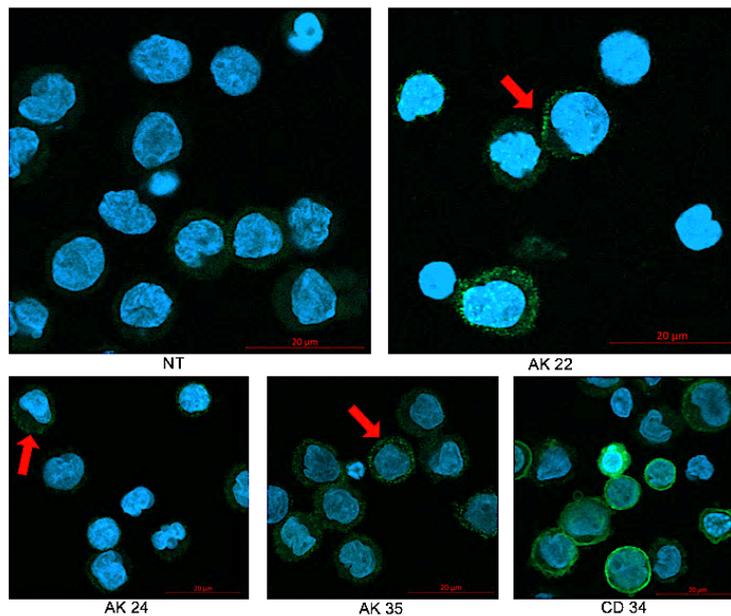


Abbildung 46: Konfokalmikroskopie des Patienten B

Dargestellt ist die Färbung des Patienten B mit den auf ihm selektionierten AK 22, 24 und 35. Als Positivkontrolle diente hierbei eine Färbung mit dem Blastenmarker CD34 (unten rechts). Als Negativkontrolle wurde indessen eine Färbung mit NT durchgeführt (oben links). Die roten Pfeile zeigen jeweils Beispiele der Membranfärbung eines jeden AK auf den Zellen des Patienten B an. Größenmarker: 20 µm;

Abkürzungsverzeichnis

Anmerkung:

Flexionen und Kasus der Abkürzungen sind entsprechend der Kontexte zu ergänzen. AML-Mutationen sind nur dann in ausgeschriebener Form angeführt, wenn sie im Fließtext in Erscheinung treten.

Abkürzung	Bedeutung
-	negativ
%	Prozent
°C	Grad Celsius
®	registered trade mark
Σ	Summe
+	positiv
∞	unendlich
2xYT	YT-Medium (siehe Materialaufstellung)
A	Adenin
AB-Serum	Serum eines Spenders der Blutgruppe AB
AG	Arbeitsgruppe
AK	Antikörper
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
AML	Akute Myeloische Leukämie
AMP	Ampicillin
AmpR	Ampicillin-Resistenzgen
anti-M13	Sekundär-Antikörper zu Detektion des Phagenproteins pVIII im FACS
APL	Akute Promyelozytenleukämie
AraC	Cytosinarabinosid
ATRA	All-trans-Retinsäure
AZ	Aktenzeichen
bp	Basenpaare
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
CBFB	core-binding factor subunit beta
CD	cluster of differentiation

- Abkürzungsverzeichnis -

CD34-AK	Antikörper, der gegen CD34 gerichtet ist
CD34-MACS	immunmagnetische Separation abhängig von CD34-Positivität der Zellen
CD34+	für den Marker CD34 positiv
CDR	complementarity determining region
CDR3-V _H	CDR3-Region der variablen Domäne der schweren Kette eines AKs
CDR3-V _L	CDR3-Region der variablen Domäne der leichten Kette eine AKs
CFU/ml	colony forming units/Milliliter
C _H 1-3	konstante Regionen der schweren Kette = heavy chain constant domain 1 - 3
C _L 1	konstante Region der leichten Kette
CLL	Chronisch Lymphatische Leukämie
CM	Colour Marker = Westernblot Marker
cm ²	Quadratzentimeter
CML	Chronisch Myeloische Leukämie
CMVPro	Cytomegalievirus-Promotor
colE1 ori	prokaryotischer Ori
CR	komplette Remission
d.h.	das heißt
DA	Depletionsantigen
DAPI	4'6-Diamidino-2-phenylindol
ddNTP	Didesoxynukleotid
DGHO	Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie
dim	diminished = vermindert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid
Dr.	Doktor
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	enhanced green fluorescence protein
Eppi-Rotator	Reaktionsgefäß-Rotator
et al.	und andere Autoren
etc.	et cetera = und so weiter
f1 ori	M13-Phagen Ori
FAB	French-American-British
Fab	fragment antigen binding

- Abkürzungsverzeichnis -

FACS	fluorescence-activated cell-sorting / scanning
FBS	fetal bovine serum
Fc	fragment crystallisable
FcR	Fc-Rezeptor
FDA	US Food and Drug Administration
Ficoll	durch Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt
FISH	fluorescence in situ hybridisation
Fitc	Fluoresceinisothiocyanat
FLT3	fms like tyrosine kinase 3
FMO	fluorescence minus one
FR1-3	Gerüstregion von einem AK = framework region 1-3
FSC	forward scatter
FSC_A	FSC_Area
FSC_H	FSC-Height
Fv	fragment variable
G	Guanin oder Granulozyten (kontextabhängig)
g	mittlere Erdbeschleunigung oder Gramm (kontextabhängig)
gamFitc	gout-anti-mouse-fluoresceinisothiocyanat
GLU	Glukose
GO	Gemtuzumab-Ozogamicin
h	Stunde(n)
H ₆ -tag	His ₆ -tag (Histidin ₆ -tag)
HCDR	CDR der schweren Kette
HCl	Salzsäure
HEK	human embryonic kidney cells, hier die Zelllinie HEK293T
HSC	hämatopoetische Stammzelle
HSCT	hämatopoetische Stammzelltransplantation
i.Allg. / i.A.	im Allgemeinen
i.d.R.	in der Regel
Ig	Immunglobulin
IMAC	immobilisierte Metallchelataffinitätschromatographie
inkl.	inklusive
inv(nn)	Inversion des Chromosoms „nn“
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IRES	interne ribosomale Eintrittsstelle

- Abkürzungsverzeichnis -

i.S.e. / i.S.	im Sinne einer / s / im Sinne
JAK2	Janus-Kinase 2
KAN	Kanamycin
kDa	Kilodalton
L	Lymphozyten
lacZPro	lacZ-Promotor
LCDR	CDR der leichten Kette
lin	linearer Maßstab
log	logarithmischer Maßstab
Lyse	erythrozytenlysiertes Vollblut
M	Monozyten oder Molar (kontextabhängig)
M-Tag	Myc-Tag
M : W-Ratio	Männer : Frauen-Ratio
MACS	magnetic-activated cell sorting = immunmagnetische Separation
max.	maximal
MFI	median fluorescence intensity
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Min.	Minuten
mind.	mindestens
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MPBS	PBS mit Milchpulver versetzt (siehe Materialaufstellung)
MRC	Medical Research Council
n.d.	nicht durchgeführt
NaOH	Natriumhydroxid
nativ	Via Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigte Zellen mit nachfolgender Kryokonservierung plus Auftauen für den jeweiligen Versuch
ng	Nanogramm
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetic Acid
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
NPM1	Nucleophosmin 1
NT	nicht transfizierter Überstand
o.ä.	oder ähnliches

- Abkürzungsverzeichnis -

o.J.	ohne Jahresangabe
O1-3	Output-Phagemid tragende Bakterien
OB	Original-Bibliothek Tomlinson J
OD	optische Dichte
Ori	origin of replication
P/S	Penicillin / Streptomycin
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PCR-H ₂ O	PCR-Wasser = Nuklease-freies Wasser
PD	Phage Display
PE	Phycoerythrin
PEG-NaCl	Polyethylenglykol-Natriumchlorid
pelB	pelB-Sequenz
PerCP	Peridin Chlorophyll Protein
PMT	Photomultiplier Tubes
Prof.	Professor
Q	Glutamin
Rabbit-anti-mouse-HRP	rabbit-anti-mouse-horseradish-peroxidase
resp.	respektive
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RPMI-Medium	Roswell Park Memorial Institute - Medium
RT	Raumtemperatur
S/N	Signal-to-Noise-ratio
SA	Streptavidin
scFv	single-chain fragment variable
scFv-Fc	single-chain fragment variable - fragment crystallisable -Minibody
scFv-pIII	single-chain fragment variable - pIII-Fusionsprotein
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
Sek.	Sekunden
sog.	sogenannt
SR	Selektionsrunde
SSC	side scatter

- Abkürzungsverzeichnis -

ssDNA	einzelsträngige DNA
St-tag	Streptococcus-tag
syn.	synonym
T	Thymin
t(nn;mm)	Translokation der Chromosomen „nn“ und „mm“
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer (siehe Materialaufstellung)
TBST	Tris-buffered saline mit Tween [®] 20 (siehe Materialaufstellung)
TBST-M	TBST mit Milchpulver versetzt (siehe Materialaufstellung)
TEA	Triethylamin (siehe Materialaufstellung)
TM	trade mark
Tris/TRIS	Puffersystem, syn. Trometamol
tRNA	Transfer-RNA
U	Einheit der Aktivität von Enzymen oder Uracil (kontextabhängig)
u.a.	unter anderem
usw.	und so weiter
UV	Ultraviolett
V	Volt
V617F-Mutation	Austausch der Aminosäure Valin an Position 617 der Aminosäurekette eines Proteins (hier JAK2) gegen Phenylalanin
VE	vollentsalzt
vgl.	vergleiche
V _H	variable Region der schweren Kette
V _L	variable Region der leichten Kette
WHO	World Health Organization
WP	Waschpuffer
WP-FACS	Waschpuffer für FACS-Versuche
x	-mal / -fach
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
ZeoR	Zeocin-Resistenz
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Menschliche Hämatopoese.....	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Antikörpers.....	12
Abbildung 3: Antikörperformate.....	14
Abbildung 4: Filamentöser Phage.....	17
Abbildung 5: Schema der Phage Display (PD)-Selektionsrunden	24
Abbildung 6: Einflüsse auf den Selektionsprozess des PD	27
Abbildung 7: pIT2-Vektor	32
Abbildung 8: pMS2-Vektor	33
Abbildung 9: FSC-SSC-Plot	37
Abbildung 10: Überlappungsbereich von Fluorochromen	38
Abbildung 11: Gatingstrategie der Kontrollen	39
Abbildung 12: Gatingstrategie des prozentualen Anteils an Blasten.....	42
Abbildung 13: Übersicht der PD-Strategien	48
Abbildung 14: Schema einer Dreifachfärbung.....	52
Abbildung 15: Spektrale Durchflusszytometrie - Gatingstrategie Blasten	72
Abbildung 16: Spektrale Durchflusszytometrie - Gatingstrategie gesunder Blutspenderzellen.....	73
Abbildung 17: Prozentuale Anreicherung an Monozyten	78
Abbildung 18: Formen des Output- / Input-Titers.....	78
Abbildung 19: Polyklonale Analyse der Patienten A, B, C und D	79
Abbildung 20: PD-Schemata mit nachfolgenden Analysen.....	81
Abbildung 21: Einzelphagenanalyse.....	82
Abbildung 22: Zuordnung der selektionierten Phagen zur verwendeten PD- Strategie.....	83
Abbildung 23: Zeocinselektionsdruck HEK293T-Zellen.....	85
Abbildung 24: Westernblot-Nachweis der scFv-Fc	86
Abbildung 25: Trypsinierung der AK 11, 22, 24 und 35.....	88
Abbildung 26: Internalisierung im konventionellen FACS.....	89
Abbildung 27: Konfokalmikroskopie der Internalisierung von AK 22 und 35.....	90
Abbildung 28: Konfokalmikroskopie des Patienten C	91
Abbildung 29: Search Details der PubMed-Suche.....	108
Abbildung 30: MACS-Kontrolle	121
Abbildung 31: Polyklonale Analyse des Patienten 0.....	123
Abbildung 32: Auswertung der Einzelphagenanalyse auf Kasumi-1.....	124
Abbildung 33: Basenabfolge und Aminosäuresequenz Insert 11.....	125

Abbildung 34: Basenabfolge und Aminosäuresequenz Insert 14	126
Abbildung 35: Basenabfolge und Aminosäuresequenz Insert 22	126
Abbildung 36: Basenabfolge und Aminosäuresequenz Insert 24	126
Abbildung 37: Basenabfolge und Aminosäuresequenz Insert 33	127
Abbildung 38: Basenabfolge und Aminosäuresequenz Insert 35	127
Abbildung 39: Basenabfolge und Aminosäuresequenz Insert 44	127
Abbildung 40: Westernblot der His-Tag-Aufreinigung	132
Abbildung 41: Coomassie-Färbung für die Massenspektrometrie	133
Abbildung 42: Massenspektrum des AK 11	134
Abbildung 43: Trypsinierungsintervalle der AK 11, 22, 24 und 35	135
Abbildung 44: Konfokalmikroskopie der Internalisierung von AK 11 und 24	136
Abbildung 45: Konfokalmikroskopie des Patienten A	137
Abbildung 46: Konfokalmikroskopie des Patienten B	137

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: WHO-Klassifikation (2016)	6
Tabelle 2: FAB-Klassifikation (1985)	7
Tabelle 3: Risikogruppen gemäß ELN 2017	8
Tabelle 4: Sequenzierungsprimer	31
Tabelle 5: Mutageneseprimer	31
Tabelle 6: Konventionelle Durchflusszytometrie – Kontrollen	38
Tabelle 7: Spektrale Durchflusszytometrie – Kontrollen	41
Tabelle 8: Waschstringenz	51
Tabelle 9: Kriterien A und B	57
Tabelle 10: Ansatz und Einstellungen der Sequenzierungs-PCR	59
Tabelle 11: Ansatz und Einstellungen der Mutagenese-PCR	60
Tabelle 12: Ansatz und Einstellungen der Kolonie-PCR	62
Tabelle 13: Prozentualer Anteil an Blasten	77
Tabelle 14: Sequenzen der CDR	84
Tabelle 15: Auswertung der FACS-Kreuzreaktivitäten auf diversen Zelllinien	87
Tabelle 16: Auswertung AML-Primärblasten in der spektralen Durchflusszytometrie	92
Tabelle 17: Charakterisierung gesunder Spenderzellen in der spektralen Durchflusszytometrie	93
Tabelle 18: Input- und Output-Titer Patient 0	121
Tabelle 19: Input- und Output-Titer Patient A	122
Tabelle 20: Input- und Output-Titer Patient B	122
Tabelle 21: Input- und Output-Titer Patient C	122
Tabelle 22: Input- und Output-Titer Patient D	122
Tabelle 23: Auswertung der polyklonalen Analyse	123
Tabelle 24: Auswertung der Einzelphagenanalyse	125

Formelverzeichnis

Formel 1: Zellzahlberechnung einer Neubauerzählkammer	35
Formel 2: Input- bzw. Output-Titer-Berechnung	47
Formel 3: Signal-to-noise-ratio	56
Formel 4: Berechnung der Menge an Insert zur Klonierung in den pMS2-Vektor	63

Literaturverzeichnis

- Ahmad, Z. A., Yeap, S. K., Ali, A. M., Ho, W. Y., Alitheen, N. B. M., & Hamid, M. (2012). scFv Antibody: Principles and Clinical Application. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2012/980250>
- Alfaleh, M., Jones, M., Howard, C., & Mahler, S. (2017). Strategies for Selecting Membrane Protein-Specific Antibodies using Phage Display with Cell-Based Panning. *Antibodies*, 6(3), 10. <https://doi.org/10.3390/antib6030010>
- Andersen, M. N., Al-Karradi, S. N. H., Kragstrup, T. W., & Hokland, M. (2016). Elimination of erroneous results in flow cytometry caused by antibody binding to Fc receptors on human monocytes and macrophages. *Cytometry Part A*, 89(11), 1001–1009. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22995>
- Arber, D. A., Orazi, A., Hasserjian, R., Thiele, J., Borowitz, M. J., Le Beau, M. M., et al. (2016). The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, 127(20), 2391–2405. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-03-643544>
- Arza, B., Félez, J., Fábregas, P., Laroche, Y., Collen, D., & Lijnen, H. R. (2000). Plasminogen binding properties of macrophage inflammatory protein (MIP)-2 α . *Thrombosis and Haemostasis*, 84(1), 71–77.
- Ashish, A. S., & Das, S. (2014). *Laboratory Manual for Biotechnology*. S.I.: S Chand & Co Ltd.
- Baenkler, H.-W., Clement, U., & Fritze, D. (Hrsg.). (2001). *Innere Medizin: 299 Synopsen (Sonderausg.)*. Stuttgart: Thieme.
- Bakker, A. B. H., van den Oudenrijn, S., Bakker, A. Q., Feller, N., van Meijer, M., Bia, J. A., et al. (2004). C-type lectin-like molecule-1: a novel myeloid cell surface marker associated with acute myeloid leukemia. *Cancer Research*, 64(22), 8443–8450. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1659>
- Barbas III, C. F., Burton, D. R., Scott, J. K., & Silverman, G. J. (2004). *Phage Display - A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Pr.
- Baumgarth, N., & Roederer, M. (2000). A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. *Journal of Immunological Methods*, 243(1), 77–97. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(00\)00229-5](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(00)00229-5)
- Berger, D. P., Mertelsmann, R., Duyster, J., & Tumorzentrum Freiburg - CCCF (Hrsg.). (2017). *Das Rote Buch: Hämatologie und internistische Onkologie (6., überarbeitete und erweiterte Auflage.)*. Landsberg am Lech: ecomed Medizin.

- Bibliographisches Institut GmbH. (2018). Duden | Re-zi-div | Rechtschreibung, Bedeutung, Definition, Synonyme. *Dudenverlag*.
<https://www.duden.de/rechtschreibung/Rezidiv>. Zugegriffen: 7. September 2018
- Bonnet, D. (2005). Normal and leukaemic stem cells. *British Journal of Haematology*, *130*(4), 469–479. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2005.05596.x>
- Bornhorst, J. A., & Falke, J. J. (2000). Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. *Methods in Enzymology*, *326*, 245–254.
- Boulter-Bitzer, J. I., Lee, H., & Trevors, J. T. (2009). Single-Chain Variable Fragment Antibodies Selected by Phage Display Against the Sporozoite Surface Antigen P23 of *Cryptosporidium parvum*. *Journal of Parasitology*, *95*(1), 75–81. <https://doi.org/10.1645/GE-1634.1>
- Budzikiewicz, H., & Schäfer, M. (2012). *Massenspektrometrie: eine Einführung* (6., vollst. überarb. und aktualisierte Aufl.). Weinheim: Wiley-VCH.
- Buselmaier, W., & Haussig, J. (2018). *Biologie für Mediziner*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-56470-7>
- Chames, P., Van Regenmortel, M., Weiss, E., & Baty, D. (2009). Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *British Journal of Pharmacology*, *157*(2), 220–233. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00190.x>
- Cheson, B. D., Bennett, J. M., Kopecky, K. J., Büchner, T., Willman, C. L., Estey, E. H., et al. (2003). Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *21*(24), 4642–4649. <https://doi.org/10.1200/JCO.2003.04.036>
- Clackson, T., & Lowman, H. B. (Hrsg.). (2004). *Phage display: a practical approach* (Bd. Chapter 1). Oxford: Oxford University Press.
- Cleff, T. (2008). *Deskriptive Statistik und moderne Datenanalyse: eine computergestützte Einführung mit Excel, SPSS und STATA* (1. Aufl.). Wiesbaden: Gabler.
- Cohen-Saidon, C., Nechushtan, H., Kahlon, S., Livni, N., Nissim, A., & Razin, E. (2003). A novel strategy using single-chain antibody to show the importance of Bcl-2 in mast cell survival. *Blood*, *102*(7), 2506–2512. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-12-3921>
- Collin, J. F., Wells, J. W., Czepulkowski, B., Lyne, L., Duriez, P. J., Banham, A. H., et al. (2015). A novel zinc finger gene, ZNF465, is inappropriately expressed in acute myeloid leukaemia cells. *Genes, Chromosomes & Cancer*, *54*(5), 288–302. <https://doi.org/10.1002/gcc.22242>

- Connor, R. I., Dinces, N. B., Howell, A. L., Romet-Lemonne, J. L., Pasquali, J. L., & Fanger, M. W. (1991). Fc receptors for IgG (Fc gamma Rs) on human monocytes and macrophages are not infectivity receptors for human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1): studies using bispecific antibodies to target HIV-1 to various myeloid cell surface molecules, including the Fc gamma R. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *88*(21), 9593–9597.
- Costa, T. R. D., Ilangovan, A., Ukleja, M., Redzej, A., Santini, J. M., Smith, T. K., et al. (2016). Structure of the Bacterial Sex F Pilus Reveals an Assembly of a Stoichiometric Protein-Phospholipid Complex. *Cell*, *166*(6), 1436-1444.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.025>
- Crépin, R., Goenaga, A.-L., Jullienne, B., Bougherara, H., Legay, C., Benihoud, K., et al. (2010). Development of human single-chain antibodies to the transferrin receptor that effectively antagonize the growth of leukemias and lymphomas. *Cancer Research*, *70*(13), 5497–5506. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-0938>
- Crowther, D., Bateman, C. J., Vartan, C. P., Whitehouse, J. M., Malpas, J. S., Fairley, G. H., & Scott, R. B. (1970). Combination chemotherapy using L-asparaginase, daunorubicin, and cytosine arabinoside in adults with acute myelogenous leukaemia. *British Medical Journal*, *4*(5734), 513–517.
- Darwin, C. (1869). *On the Origin of Species by Means of Natural Selection: Or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life*. D. Appleton.
- de Wildt, R. M. T., Hoet, R. M. A., van Venrooij, W. J., Tomlinson, I. M., & Winter, G. (1999). Analysis of Heavy and Light Chain Pairings Indicates that Receptor Editing Shapes the Human Antibody Repertoire. *Journal of Molecular Biology*, *285*(3), 895–901. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.2396>
- de Wildt, R. M. T., Mundy, C. R., Gorick, B. D., & Tomlinson, I. M. (2000). Antibody arrays for high-throughput screening of antibody–antigen interactions. *Nature Biotechnology*, *18*(9), 989–994. <https://doi.org/10.1038/79494>
- Delirez, N., Shojaeefar, E., Parvin, P., & Asadi, B. (2013). Comparison the effects of two monocyte isolation methods, plastic adherence and magnetic activated cell sorting methods, on phagocytic activity of generated dendritic cells. *Cell Journal*, *15*(3), 218–223.
- Derda, R., Tang, S., Li, S. C., Ng, S., Matochko, W., & Jafari, M. (2011). Diversity of Phage-Displayed Libraries of Peptides during Panning and Amplification. *Molecules*, *16*(2), 1776–1803. <https://doi.org/10.3390/molecules16021776>

- Ding, L., Ley, T. J., Larson, D. E., Miller, C. A., Koboldt, D. C., Welch, J. S., et al. (2012). Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature*, *481*(7382), 506–510. <https://doi.org/10.1038/nature10738>
- Döhner, H., Estey, E., Grimwade, D., Amadori, S., Appelbaum, F. R., Büchner, T., et al. (2017). Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*, *129*(4), 424–447. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-08-733196>
- Döhner, H., Weisdorf, D. J., & Bloomfield, C. D. (2015). Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*, *373*(12), 1136–1152. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1406184>
- Dudgeon, K., Rouet, R., Kokmeijer, I., Schofield, P., Stolp, J., Langley, D., et al. (2012). General strategy for the generation of human antibody variable domains with increased aggregation resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(27), 10879–10884. <https://doi.org/10.1073/pnas.1202866109>
- Ebrahimizadeh, W., & Rajabibazl, M. (2014). Bacteriophage Vehicles for Phage Display: Biology, Mechanism, and Application. *Current Microbiology*, *69*(2), 109–120. <https://doi.org/10.1007/s00284-014-0557-0>
- Ehrlich, P. (1909). Über den jetzigen Stand der Chemotherapie. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, *42*(1), 17–47. <https://doi.org/10.1002/cber.19090420105>
- Eteshola, E. (2010). Isolation of scFv fragments specific for monokine induced by interferon-gamma (MIG) using phage display. *Journal of Immunological Methods*, *358*(1–2), 104–110. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2010.04.003>
- Feng, Y., Wang, Y., Zhu, Z., Li, W., Sussman, R. T., Randall, M., et al. (2016). Differential killing of CD56-expressing cells by drug-conjugated human antibodies targeting membrane-distal and membrane-proximal non-overlapping epitopes. *mAbs*, *8*(4), 799–810. <https://doi.org/10.1080/19420862.2016.1155014>
- Fitting, J. (2012). *Generierung, Charakterisierung und Funktionalisierung rekombinanter Antikörperfragmente gegen leukämische und dendritische Zellen*. RWTH Aachen University.
- Fitting, J., Blume, T., Ten Haaf, A., Blau, W., Gattenlöhner, S., Tur, M. K., & Barth, S. (2015). Phage display-based generation of novel internalizing antibody fragments for immunotoxin-based treatment of acute myeloid leukemia. *mAbs*, *7*(2), 390–402. <https://doi.org/10.1080/19420862.2015.1007818>
- Frenzel, A., Schirrmann, T., & Hust, M. (2016). Phage display-derived human antibodies in clinical development and therapy. *mAbs*, *8*(7), 1177–1194. <https://doi.org/10.1080/19420862.2016.1212149>

- Futamura, K., Sekino, M., Hata, A., Ikebuchi, R., Nakanishi, Y., Egawa, G., et al. (2015). Novel full-spectral flow cytometry with multiple spectrally-adjacent fluorescent proteins and fluorochromes and visualization of in vivo cellular movement: Spectral Flow Cytometry with Multiple Probes. *Cytometry Part A*, 87(9), 830–842. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22725>
- Galili, N., Devemy, E., & Raza, A. (2008). Isolation of specific and biologically active peptides that bind cells from patients with acute myeloid leukemia (AML). *Journal of Hematology & Oncology*, 1, 8. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-1-8>
- Gao, C., Mao, S., Kaufmann, G., Wirsching, P., Lerner, R. A., & Janda, K. D. (2002). A method for the generation of combinatorial antibody libraries using pIX phage display. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(20), 12612–12616. <https://doi.org/10.1073/pnas.192467999>
- Gbadamosi, M., Meshinchi, S., & Lamba, J. K. (2018). Gemtuzumab ozogamicin for treatment of newly diagnosed CD33-positive acute myeloid leukemia. *Future Oncology (London, England)*, 14(30), 3199–3213. <https://doi.org/10.2217/fon-2018-0325>
- Geneservice (Hrsg.). (o. J.). Human Single Fold scFv Libraries I + J (Tomlinson I + J). <http://docplayer.net/30268507-Human-single-fold-scfv-libraries-i-j-tomlinson-i-j.html>. Zugegriffen: 25. August 2018
- Geuijen, C. A. W., Bijl, N., Smit, R. C. M., Cox, F., Throsby, M., Visser, T. J., et al. (2005). A proteomic approach to tumour target identification using phage display, affinity purification and mass spectrometry. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, 41(1), 178–187. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2004.10.008>
- Giesecke, C., & Kaiser, T. (2017). Neue Spektren in der Durchflusszytometrie. *BIOspektrum*, 23(6), 658–661. <https://doi.org/10.1007/s12268-017-0854-9>
- Gressner, A. M., & Arndt, T. (Hrsg.). (2018). *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Springer Berlin Heidelberg. <http://rose.scranton.edu/login?url=http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-48986-4>. Zugegriffen: 30. Juni 2020
- Griffiths, A. D., & Duncan, A. R. (1998). Strategies for selection of antibodies by phage display. *Current Opinion in Biotechnology*, 9(1), 102–108. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(98\)80092-X](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(98)80092-X)
- Hairul Bahara, N. H., Chin, S. T., Choong, Y. S., & Lim, T. S. (2016). Construction of a Semisynthetic Human VH Single-Domain Antibody Library and Selection of Domain Antibodies against α -Crystalline of Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Biomolecular Screening*, 21(1), 35–43. <https://doi.org/10.1177/1087057115609144>

- Harper, J., Mao, S., Strout, P., & Kamal, A. (2013). Selecting an optimal antibody for antibody-drug conjugate therapy: internalization and intracellular localization. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1045, 41–49. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-541-5_3
- Haziot, A., Chen, S., Ferrero, E., Low, M. G., Silber, R., & Goyert, S. M. (1988). The monocyte differentiation antigen, CD14, is anchored to the cell membrane by a phosphatidylinositol linkage. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 141(2), 547–552.
- Hermey, G. (Hrsg.). (2010). *Der Experimentator: Neurowissenschaften*. Heidelberg: Spektrum, Akad. Verl.
- Herold, G. (Hrsg.). (2018). *Innere Medizin 2018: eine vorlesungsorientierte Darstellung: unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung: mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis*. Köln: Gerd Herold.
- Herr, W., & Bader, P. (Hrsg.). (2015). *Hämatopoetische Stammzellen: Grundlagen und klinische Einsatzgebiete ; mit 50 Tabellen*. Köln: Dt. Ärzte-Verl.
- Herrington, M. B. (2018). Nonsense Mutations and Suppression. In John Wiley & Sons Ltd (Hrsg.), *eLS* (S. 1–10). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000824.pub3>
- Holliger, P., & Hudson, P. J. (2005). Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nature Biotechnology*, 23(9), 1126–1136. <https://doi.org/10.1038/nbt1142>
- Honecker, F., Claßen, J., Preiß, J., Dornoff, W., & W. Zuckschwerdt Verlag GmbH für Medizin u. Naturwissensch. (2020). *Taschenbuch Onkologie Interdisziplinäre Empfehlungen zur Therapie 2020/2021*.
- Invitrogen. (2015). Flow cytometry panel design: The basics. *BioProbes*, 71. <http://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/technical-reference-library/newsletters-journals/bioprobepdfs/bp71/bp71-full-issue.pdf>.
Zugegriffen: 16. Oktober 2018
- Jacquemin, M. (2010). Variable region heavy chain glycosylation determines the anticoagulant activity of a factor VIII antibody. *Haemophilia: The Official Journal of the World Federation of Hemophilia*, 16(102), 16–19. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2010.02233.x>
- Jaffe, E. S. (Hrsg.). (2011). *Hematopathology*. Philadelphia, Pa: Saunders, Elsevier.
- Jäger, S., Jahnke, A., Wilmes, T., Adebahr, S., Vögtle, F.-N., Delima-Hahn, E., et al. (2007). Leukemia-targeting ligands isolated from phage-display peptide libraries. *Leukemia*, 21(3), 411–420. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404548>

- Kaplon, H., & Reichert, J. M. (2018). Antibodies to watch in 2018. *mAbs*, *10*(2), 183–203. <https://doi.org/10.1080/19420862.2018.1415671>
- Karjalainen, K., Jaalouk, D. E., Bueso-Ramos, C. E., Zurita, A. J., Kuniyasu, A., Eckhardt, B. L., et al. (2011). Targeting neuropilin-1 in human leukemia and lymphoma. *Blood*, *117*(3), 920–927. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-05-282921>
- Kassim, A. A., & Savani, B. N. (2017). Hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia: A review. *Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy*, *10*(4), 245–251. <https://doi.org/10.1016/j.hemonc.2017.05.021>
- Kayser, F. H., Böttger, E. C., Deplazes, P., Haller, O., & Roers, A. (Hrsg.). (2014). *Taschenlehrbuch Medizinische Mikrobiologie: Hygiene, Immunologie, Bakteriologie, Virologie, Mykologie, Parasitologie, Infektiologie* (13., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage.). Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Kayser, S., & Levis, M. J. (2018). Advances in targeted therapy for acute myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology*, *180*(4), 484–500. <https://doi.org/10.1111/bjh.15032>
- Kiefel, V., & Mueller-Eckhardt, C. (Hrsg.). (2010). *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie: Grundlagen - Therapie - Methodik* (4., überarb. und erw. Aufl.). Berlin: Springer Medizin.
- King, D. J. (1998). *Applications and engineering of monoclonal antibodies*. London: Taylor & Francis.
- Knippers, R. (2006). *Molekulare Genetik* (9., komplett überarb. Aufl.). Stuttgart: Thieme.
- Köhler, G., & Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, *256*(5517), 495–497. <https://doi.org/10.1038/256495a0>
- Kralovics, R., Passamonti, F., Buser, A. S., Teo, S.-S., Tiedt, R., Passweg, J. R., et al. (2005). A Gain-of-Function Mutation of *JAK2* in Myeloproliferative Disorders. *New England Journal of Medicine*, *352*(17), 1779–1790. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa051113>
- Kuroda, D., Shirai, H., Kobori, M., & Nakamura, H. (2008). Structural classification of CDR-H3 revisited: A lesson in antibody modeling. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, *73*(3), 608–620. <https://doi.org/10.1002/prot.22087>
- Kuzmicheva, G. A., Jayanna, P. K., Sorokulova, I. B., & Petrenko, V. A. (2009). Diversity and censoring of landscape phage libraries. *Protein Engineering, Design and Selection*, *22*(1), 9–18. <https://doi.org/10.1093/protein/gzn060>
- Le Gall, M., Crépin, R., Neiveyans, M., Auclair, C., Fan, Y., Zhou, Y., et al. (2015). Neutralization of KIT Oncogenic Signaling in Leukemia with Antibodies Targeting

- KIT Membrane Proximal Domain 5. *Molecular Cancer Therapeutics*, 14(11), 2595–2605. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-15-0321>
- Leach, R. M., Drummond, M., & Doig, A. (2013). *Practical flow cytometry in haematology diagnosis*. Chichester, West Sussex, UK: Wiley-Blackwell.
- Leavy, O. (2010). Therapeutic antibodies: past, present and future. *Nature Reviews Immunology*, 10(5), 297–297. <https://doi.org/10.1038/nri2763>
- Lengfelder, E., Lambert, J.-F., Nachbaur, D., Niederwieser, D., Platzbecker, U., Schlenk, R. F., & Wörmann, B. (2018, Januar). Onkopedia Leitlinie - Akute Promyelozyten Leukämie (APL). (DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V., Hrsg.). <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/akute-promyelozyten-leukaemie-apl/@@view/html/index.html>
- Li, K., Lv, X.-X., Hua, F., Lin, H., Sun, W., Cao, W.-B., et al. (2014). Targeting acute myeloid leukemia with a proapoptotic peptide conjugated to a Toll-like receptor 2-mediated cell-penetrating peptide. *International Journal of Cancer*, 134(3), 692–702. <https://doi.org/10.1002/ijc.28382>
- Li, Z., Krippendorff, B.-F., Sharma, S., Walz, A. C., Lavé, T., & Shah, D. K. (2016). Influence of molecular size on tissue distribution of antibody fragments. *mAbs*, 8(1), 113–119. <https://doi.org/10.1080/19420862.2015.1111497>
- Liu, J. K. H. (2014). The history of monoclonal antibody development – Progress, remaining challenges and future innovations. *Annals of Medicine and Surgery*, 3(4), 113–116. <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2014.09.001>
- Louis, K. S., & Siegel, A. C. (2011). Cell Viability Analysis Using Trypan Blue: Manual and Automated Methods. In M. J. Stoddart (Hrsg.), *Mammalian Cell Viability* (Bd. 740, S. 7–12). Totowa, NJ: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6_2
- Luo, Q., Xiao, P., Li, X., Deng, Z., Qing, C., Su, R., et al. (2018). Overexpression of CD64 on CD14⁺⁺CD16⁻ and CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes of rheumatoid arthritis patients correlates with disease activity. *Experimental and Therapeutic Medicine*. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.6452>
- Luttmann, W., Bratke, K., Küpper, M., & Myrtek, D. (2014). *Der Experimentator: Immunologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-41899-0>
- Mahy, B. W. J. (2009). *The dictionary of virology* (4th ed.). Amsterdam: Elsevier, Acad. Pr.
- Marcus, W. D., Lindsay, S. M., & Sierks, M. R. (2006). Identification and Repair of Positive Binding Antibodies Containing Randomly Generated Amber Codons

- from Synthetic Phage Display Libraries. *Biotechnology Progress*, 22(3), 919–922. <https://doi.org/10.1021/bp050420y>
- Marcus, W. D., Wang, H., Lohr, D., Sierks, M. R., & Lindsay, S. M. (2006). Isolation of an scFv targeting BRG1 using phage display with characterization by AFM. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 342(4), 1123–1129. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.02.073>
- McCafferty, J., Griffiths, A. D., Winter, G., & Chiswell, D. J. (1990). Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*, 348(6301), 552–554. <https://doi.org/10.1038/348552a0>
- Medinger, M., Lengerke, C., & Passweg, J. (2016). Novel therapeutic options in Acute Myeloid Leukemia. *Leukemia Research Reports*, 6, 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.lrr.2016.09.001>
- Menendez, A., & Scott, J. K. (2005). The nature of target-unrelated peptides recovered in the screening of phage-displayed random peptide libraries with antibodies. *Analytical Biochemistry*, 336(2), 145–157. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.09.048>
- Mohseni Nodehi, S., Repp, R., Kellner, C., Bräutigam, J., Staudinger, M., Schub, N., et al. (2012). Enhanced ADCC activity of affinity matured and Fc-engineered mini-antibodies directed against the AML stem cell antigen CD96. *PloS One*, 7(8), e42426. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042426>
- Moll, I., Jung, E. G., & Augustin, M. (Hrsg.). (2005). *Dermatologie: 119 Tabellen; [mit Blickdiagnosen und Quizfragen auf CD-ROM]* (6., komplett überarb. und erw. Aufl.). Stuttgart: Thieme.
- Moradi-Kalbolandi, S., Davani, D., Golkar, M., Habibi-Anbouhi, M., Abolhassani, M., & Shokrgozar, M. A. (2016). Soluble Expression and Characterization of a New scFv Directed to Human CD123. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 178(7), 1390–1406. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1954-y>
- Moutel, S., El Marjou, A., Vielemeyer, O., Nizak, C., Benaroch, P., Dübel, S., & Perez, F. (2009). A multi-Fc-species system for recombinant antibody production. *BMC Biotechnology*, 9(1), 14. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-9-14>
- Mülhardt, C. (2013). *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-34636-1>
- Murphy, K. M., Travers, P., Walport, M., & Janeway, C. (2014). *Janeway Immunologie*. (L. Seidler & I. Haußer-Siller, Übers.) (7., Auflage, korrigierter Nachdruck 2014.). Berlin Heidelberg: Springer Spektrum.

- Navarro, F., & Muniesa, M. (2017). Phages in the Human Body. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00566>
- Nelson, A. L. (2010). Antibody fragments: hope and hype. *mAbs*, 2(1), 77–83. <https://doi.org/10.4161/mabs.2.1.10786>
- Nolan, J. P., & Condello, D. (2013). Spectral Flow Cytometry. In J. P. Robinson, Z. Darzynkiewicz, J. Dobrucki, W. C. Hyun, J. P. Nolan, A. Orfao, & P. S. Rabinovitch (Hrsg.), *Current Protocols in Cytometry*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/0471142956.cy0127s63>
- Ogawa, M. (1993). Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood*, 81(11), 2844–2853.
- OpenStax. (2013). Production of the Formed Elements. In OpenStax CNX (Hrsg.), . <http://cnx.org/contents/019f4238-3211-49d3-8a7f-55a57e8ddca4@5>.
- Ow, D. S.-W., Lim, D. Y.-X., Nissom, P. M., Camattari, A., & Wong, V. V.-T. (2010). Co-expression of Skp and FkpA chaperones improves cell viability and alters the global expression of stress response genes during scFvD1.3 production. *Microbial Cell Factories*, 9, 22. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-22>
- Paschke, M. (2006). Phage display systems and their applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70(1), 2–11. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0270-9>
- Persson, H., Ye, W., Wernimont, A., Adams, J. J., Koide, A., Koide, S., et al. (2013). CDR-H3 Diversity Is Not Required for Antigen Recognition by Synthetic Antibodies. *Journal of Molecular Biology*, 425(4), 803–811. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.11.037>
- Piloto, O., Levis, M., Huso, D., Li, Y., Li, H., Wang, M.-N., et al. (2005). Inhibitory anti-FLT3 antibodies are capable of mediating antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity and reducing engraftment of acute myelogenous leukemia blasts in nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice. *Cancer Research*, 65(4), 1514–1522. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-3081>
- Pokorny, N. J., Boulter-Bitzer, J. I., Hall, J. C., Trevors, J. T., & Lee, H. (2008). Inhibition of *Cryptosporidium parvum* infection of a mammalian cell culture by recombinant scFv antibodies. *Antonie van Leeuwenhoek*, 94(3), 353–364. <https://doi.org/10.1007/s10482-008-9252-0>
- Porter, R. R. (1959). The hydrolysis of rabbit γ -globulin and antibodies with crystalline papain. *The Biochemical Journal*, 73, 119–126.
- Qi, H., Lu, H., Qiu, H.-J., Petrenko, V., & Liu, A. (2012). Phagemid Vectors for Phage Display: Properties, Characteristics and Construction. *Journal of Molecular Biology*, 417(3), 129–143. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.01.038>

- Qiang, X., Sun, K., Xing, L., Xu, Y., Wang, H., Zhou, Z., et al. (2017). Discovery of a polystyrene binding peptide isolated from phage display library and its application in peptide immobilization. *Scientific Reports*, 7(1), 2673. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02891-x>
- Rassow, J. (Hrsg.). (2012). *Biochemie: 67 Tabellen ; [mit Stoffwechselweg-Animationen]* (3., vollst. überarb. und erw. Aufl.). Stuttgart: Thieme.
- Rehm, H., & Letzel, T. (2016). *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics* (7., überarbeitete und aktualisierte Auflage.). Berlin Heidelberg: Springer Spektrum.
- Reilly, J. T. (2005). Pathogenesis of acute myeloid leukaemia and inv(16)(p13;q22): a paradigm for understanding leukaemogenesis? *British Journal of Haematology*, 128(1), 18–34. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2004.05236.x>
- Reunanen, J., Ranta, T.-M., Peñate-Medina, O., Suojanen, J., Sorsa, T., Salo, T., et al. (2010). A chimera of green fluorescent protein with gelatinase binding and tumor targeting peptide. *Protein Expression and Purification*, 72(2), 234–237. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2010.03.023>
- Ricart, A. D. (2011). Antibody-Drug Conjugates of Calicheamicin Derivative: Gemtuzumab Ozogamicin and Inotuzumab Ozogamicin. *Clinical Cancer Research*, 17(20), 6417–6427. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-0486>
- Roederer, M. (2001). Spectral compensation for flow cytometry: Visualization artifacts, limitations, and caveats. *Cytometry*, 45(3), 194–205. [https://doi.org/10.1002/1097-0320\(20011101\)45:3<194::AID-CYTO1163>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/1097-0320(20011101)45:3<194::AID-CYTO1163>3.0.CO;2-C)
- Röllig, C., Beelen, D. W., Braess, J., Greil, R., Niederwieser, D., Passweg, J., et al. (2018, April). Onkopedia Leitlinie - Akute Myeloische Leukämie (AML). (DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V., Hrsg.). www.onkopedia.com. Zugegriffen: 6. September 2018
- Röllig, C., Beelen, D. W., Braess, J., Greil, R., Niederwieser, D., Passweg, J., et al. (2019, Oktober). Onkopedia Leitlinie - Akute Myeloische Leukämie (AML). (DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V., Hrsg.). <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/akute-myeloische-leukaemie-aml/@@guideline/html/index.html>. Zugegriffen: 30. Juni 2020
- Rondot, S., Koch, J., Breitling, F., & Dübel, S. (2001). A helper phage to improve single-chain antibody presentation in phage display. *Nature Biotechnology*, 19(1), 75–78. <https://doi.org/10.1038/83567>

- Rowe, J. M., & Lowenberg, B. (2013). Gemtuzumab ozogamicin in acute myeloid leukemia: a remarkable saga about an active drug. *Blood*, *121*(24), 4838–4841. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-03-490482>
- Sasso, E., D'Avino, C., Passariello, M., D'Alise, A. M., Siciliano, D., Esposito, M. L., et al. (2018). Massive parallel screening of phage libraries for the generation of repertoires of human immunomodulatory monoclonal antibodies. *mAbs*, 1–13. <https://doi.org/10.1080/19420862.2018.1496772>
- Sauermost, R., & Freudig, D. (1999a). Antikörpervalenz. In *Lexikon der Biologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/antikoerpervalenz/4118>. Zugegriffen: 5. September 2018
- Sauermost, R., & Freudig, D. (1999b). stuffer-Fragment. In *Lexikon der Biologie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag. <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/stuffer-fragment/64411>. Zugegriffen: 17. Oktober 2018
- Saultz, J., & Garzon, R. (2016). Acute Myeloid Leukemia: A Concise Review. *Journal of Clinical Medicine*, *5*(3), 33. <https://doi.org/10.3390/jcm5030033>
- Schad, K. (2008). *Generierung dendritischer Zellen in vitro innerhalb von 48 Stunden: Optimierung des Reifungsprotokolls und Induktion einer Antigen-spezifischen Immunantwort*. Ludwig-Maximilians-Universität zu München, München.
- Schafferus, M. (2012). *Die Rolle von regulatorischen T-Zellen in der Immunantwort gegen intrazelluläre Bakterien: Analysen im DEREK-Mausmodell*. Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg, Hamburg. Abgerufen von <http://ediss.sub.uni-hamburg.de/volltexte/2012/5993/pdf/Dissertation.pdf>
- Schiffer, C. A., & Gurbuxani, S. (2017a, Mai 24). Classification of acute myeloid leukemia. (UpToDate, Hrsg.). https://www.uptodate.com/contents/classification-of-acute-myeloid-leukemia?topicRef=94786&source=see_link. Zugegriffen: 19. September 2018
- Schiffer, C. A., & Gurbuxani, S. (2017b, Juni 7). Clinical manifestations, pathological features, and diagnosis of acute myeloid leukemia. (UpToDate, Hrsg.). https://www.uptodate.com/contents/clinical-manifestations-pathologic-features-and-diagnosis-of-acute-myeloid-leukemia?topicRef=681&source=see_link. Zugegriffen: 7. September 2018
- Seita, J., & Weissman, I. L. (2010). Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Systems Biology and Medicine*, *2*(6), 640–653. <https://doi.org/10.1002/wsbm.86>

- Shen, Z., Yan, H., Zhang, Y., Mernaugh, R. L., & Zeng, X. (2008). Engineering peptide linkers for scFv immunosensors. *Analytical Chemistry*, 80(6), 1910–1917. <https://doi.org/10.1021/ac7018624>
- Shlush, L. I., & Mitchell, A. (2015). AML evolution from preleukemia to leukemia and relapse. *Best Practice & Research. Clinical Haematology*, 28(2–3), 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.beha.2015.10.004>
- Sidney, L. E., Branch, M. J., Dunphy, S. E., Dua, H. S., & Hopkinson, A. (2014). Concise review: evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 32(6), 1380–1389. <https://doi.org/10.1002/stem.1661>
- Siegenthaler, W., & Amann-Vesti, B. (Hrsg.). (2006). *Klinische Pathophysiologie: 239 Tabellen* (9., völlig neu bearb. Aufl.). Stuttgart: Thieme.
- Singh, A. K., & McGuirk, J. P. (2016). Allogeneic Stem Cell Transplantation: A Historical and Scientific Overview. *Cancer Research*, 76(22), 6445–6451. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-1311>
- Smith, G. P. (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, 228(4705), 1315–1317. <https://doi.org/10.1126/science.4001944>
- Smith, G. P., & Petrenko, V. A. (1997). Phage Display. *Chemical Reviews*, 97(2), 391–410. <https://doi.org/10.1021/cr960065d>
- Southam, C. M., Craver, L. F., Dargeon, H. W., & Burchenal, J. H. (1951). A study of the natural history of acute leukemia with special reference to the duration of the disease and the occurrence of remissions. *Cancer*, 4(1), 39–59.
- Spencer, H. (1864). *The Principles of Biology*. Williams and Norgate. <http://archive.org/details/principlesbiolo05spengoog>. Zugegriffen: 28. August 2018
- Spiestersbach, A., Kubicek, J., Schäfer, F., Block, H., & Maertens, B. (2015). Purification of His-Tagged Proteins. In *Methods in Enzymology* (Bd. 559, S. 1–15). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2014.11.003>
- Stein, C., Kellner, C., Kügler, M., Reiff, N., Mentz, K., Schwenkert, M., et al. (2010). Novel conjugates of single-chain Fv antibody fragments specific for stem cell antigen CD123 mediate potent death of acute myeloid leukaemia cells. *British Journal of Haematology*, 148(6), 879–889. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2009.08033.x>
- Stevenson, G. T. (2006). CD38 as a therapeutic target. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)*, 12(11–12), 345–346. <https://doi.org/10.2119/2006-00082.Stevenson>

- Stock, W., & Thirman, M. (2017, September 4). Pathogenesis of acute myeloid leukemia. (UpToDate, Hrsg.). <https://www.uptodate.com/contents/pathogenesis-of-acute-myeloid-leukemia>. Zugegriffen: 7. September 2018
- Strassberger, V., Gutbrodt, K. L., Krall, N., Roesli, C., Takizawa, H., Manz, M. G., et al. (2014). A comprehensive surface proteome analysis of myeloid leukemia cell lines for therapeutic antibody development. *Journal of Proteomics*, 99, 138–151. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.01.022>
- Strebhardt, K., & Ullrich, A. (2008). Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. *Nature Reviews Cancer*, 8(6), 473–480. <https://doi.org/10.1038/nrc2394>
- Strutz, J., & Arndt, O. (Hrsg.). (2001). *Praxis der HNO-Heilkunde, Kopf- und Halschirurgie: 275 Tabellen*. Stuttgart: Thieme.
- Suojanen, J., Reunanen, J., Ranta, T.-M., Peñate-Medina, O., Salo, T., Saris, P., & Sorsa, T. (2014). Peptides against Mac-1 do not sufficiently target leukemia or lymphoma in vivo. *Anticancer Research*, 34(2), 645–650.
- 't Hoen, P. A. C., Jirka, S. M. G., ten Broeke, B. R., Schultes, E. A., Aguilera, B., Pang, K. H., et al. (2012). Phage display screening without repetitious selection rounds. *Analytical Biochemistry*, 421(2), 622–631. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.11.005>
- Talati, C., & Sweet, K. (2018). Recently approved therapies in acute myeloid leukemia: A complex treatment landscape. *Leukemia Research*, 73, 58–66. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2018.09.001>
- ten Haaf, A. (2015). *On Slide Selektion auf Formalin-fixiertem und in Paraffin-eingebettetem (FFPE) Patientengewebe zur Generierung spezifischer Antikörper mittels Phage Display Technologie*. Justus-Liebig-Universität Gießen. Abgerufen von <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2015/11638/>
- The Nobel Foundation (Hrsg.). (2018a, Oktober 17). Sir Gregory P. Winter – Facts. Nobel Media AB 2018. <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2018/winter/facts/>. Zugegriffen: 17. Oktober 2018
- The Nobel Foundation (Hrsg.). (2018b, Oktober 17). George P. Smith – Facts. Nobel Media AB 2018. <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2018/smith/facts/>. Zugegriffen: 17. Oktober 2018
- Thomas, W. D., Golomb, M., & Smith, G. P. (2010). Corruption of phage display libraries by target-unrelated clones: Diagnosis and countermeasures. *Analytical Biochemistry*, 407(2), 237–240. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.07.037>

- Tikunova, N. V., & Morozova, V. V. (2009). Phage display on the base of filamentous bacteriophages: application for recombinant antibodies selection. *Acta Naturae*, 1(3), 20–28.
- Tiller, K. E., & Tessier, P. M. (2015). Advances in Antibody Design. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 17(1), 191–216. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071114-040733>
- Tsuchiya, Y., & Mizuguchi, K. (2016). The diversity of H3 loops determines the antigen-binding tendencies of antibody CDR loops: Analysis of Diverse Conformations of Long CDR-H3 Loops. *Protein Science*, 25(4), 815–825. <https://doi.org/10.1002/pro.2874>
- Tung, J. W., Parks, D. R., Moore, W. A., Herzenberg, L. A., & Herzenberg, L. A. (2004). New approaches to fluorescence compensation and visualization of FACS data. *Clinical Immunology*, 110(3), 277–283. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2003.11.016>
- University of Aberdeen. (2020, Juni 30). Scottish Biologics Facility Libraries. University of Aberdeen. <https://www.abdn.ac.uk/sbf/about/sbf-libraries/>
- UWCCC Flow Cytometry Laboratory. (2014). Doublet Discrimination. University of Wisconsin Carbone Cancer Center Flow Lab 10/24/14 RS 1.0. https://cancer.wisc.edu/research/wp-content/uploads/2017/08/Flow_TechNotes_Doublet-Discrimination_20170918.pdf
- Vieira, J., & Messing, J. (1987). [1] Production of single-stranded plasmid DNA. In *Methods in Enzymology* (Bd. 153, S. 3–11). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)53044-0](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)53044-0)
- Vodnik, M., Zager, U., Strukelj, B., & Lunder, M. (2011). Phage Display: Selecting Straws Instead of a Needle from a Haystack. *Molecules*, 16(1), 790–817. <https://doi.org/10.3390/molecules16010790>
- Wahl, L. M., Wahl, S. M., Smythies, L. E., & Smith, P. D. (2006). Isolation of Human Monocyte Populations. In J. E. Coligan, B. E. Bierer, D. H. Margulies, E. M. Shevach, & W. Strober (Hrsg.), *Current Protocols in Immunology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im0706as70>
- Wang, X., Katayama, A., Wang, Y., Yu, L., Favoino, E., Sakakura, K., et al. (2011). Functional characterization of an scFv-Fc antibody that immunotherapeutically targets the common cancer cell surface proteoglycan CSPG4. *Cancer Research*, 71(24), 7410–7422. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1134>

- Wang, Y. A., Yu, X., Silverman, P. M., Harris, R. L., & Egelman, E. H. (2009). The Structure of F-Pili. *Journal of Molecular Biology*, 385(1), 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.10.054>
- Watts, J., & Nimer, S. (2018). Recent advances in the understanding and treatment of acute myeloid leukemia. *F1000Research*, 7, 1196. <https://doi.org/10.12688/f1000research.14116.1>
- Weisser, N. E., & Hall, J. C. (2009). Applications of single-chain variable fragment antibodies in therapeutics and diagnostics. *Biotechnology Advances*, 27(4), 502–520. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.04.004>
- Weissleder, R. (Hrsg.). (2010). *Molecular imaging: principles and practice*. Shelton, Conn: People's Medical Pub. House--USA.
- Wilson, I. A., & Stanfield, R. L. (1994). Antibody-antigen interactions: new structures and new conformational changes. *Current Opinion in Structural Biology*, 4(6), 857–867. [https://doi.org/10.1016/0959-440X\(94\)90267-4](https://doi.org/10.1016/0959-440X(94)90267-4)
- Wink, M. (Hrsg.). (2011). *Molekulare Biotechnologie: Konzepte, Methoden und Anwendungen* (2., aktualisierte Aufl.). Weinheim: Wiley-VCH.
- Wu, S., Ke, A., & Doudna, J. A. (2007). A fast and efficient procedure to produce scFvs specific for large macromolecular complexes. *Journal of Immunological Methods*, 318(1–2), 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2006.10.005>
- Zourob, M., Elwary, S., & Turner, A. P. F. (Hrsg.). (2008). *Principles of bacterial detection: biosensors, recognition receptors, and microsystems*. New York: Springer.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, ohne deren Mithilfe vorliegende Dissertation nicht existieren würde:

Herrn Prof. Dr. Stefan Gattenlöhner für seine Unterstützung als Doktorvater und seine Amtsausübung als Erstgutachter dieser Dissertation.

Herrn Prof. Dr. Mathias Rummel für seine Funktion als Zweitgutachter.

Herrn Dr. Mehmet Kemal Tur für konstruktive Gespräche sowie seine Expertise.

Frau Sibylle Pscherer für viele gemeinsame Stunden im Labor sowie der AG Experimentelle Pathologie / Immuntherapie und allen Mitarbeitern des Instituts für Pathologie für ihre gute und kollegiale Unterstützung.

Herrn Dr. Wolfgang Blau für die Ausübung seiner Tätigkeit als Prüfarzt sowie für interessante und lehrreiche Gespräche.

Der Medizinischen Klinik IV unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Mathias Rummel für die gute klinische Unterstützung.

Allen AML-Patienten und allen gesunden Spendern für jeden einzelnen Blutstropfen.

Den Mitarbeitern der AG von Herrn Prof. Dr. Günter Lochnit für ihre massenspektrometrischen Auswertungen.

Den Mitarbeitern der AG von Herrn Prof. Dr. Gregor Bein für ihre Unterstützung in der spektralen Durchflusszytometrie.

Dem JLU-Trainee-Programm (ehemals Prägraduierertenkolleg) der Justus-Liebig-Universität Gießen für die monetäre Unterstützung meines Forschungssemesters.

Herrn Burkhard Blick für das detaillierte Korrekturlesen.

Frau Dr. Andrea Kurz für Motivation stets zur rechten Zeit.

Meiner Familie – ohne ihre stetige Unterstützung wäre ich nicht da, wo ich bin.

Publikationsverzeichnis

Abstract:

AML-Specific Antibodies Obtained by Optimized Phage Display Selection Strategies

Weber, Theresa *et al.*

Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia, Volume 19, S202.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clml.2019.07.058>

Vorgestellt als Poster-Präsentation auf der Jahrestagung der Society of Hematologic Oncology (SOHO) 2019 in Houston, USA.

Abstract:

Standardised Phage Display Panning Protocols for the Generation of AML-specific and Internalising Antibodies

Weber, Theresa *et al.*

Oncol Res Treat 2019; 42 (suppl 4), pp. 72-73.

DOI: <https://doi.org/10.1159/000502425>

Vorgestellt als freier Vortrag auf der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO) 2019 in Berlin, Deutschland.

Paper:

Parallel Evaluation of Different Cell-based Phage Display Panning Strategies: Optimised Selection and Depletion Steps Result in AML Blast-binding Consensus Antibodies

Weber, Theresa *et al.*

Mol Med Rep. 2021 Nov; 24(5):767.

Epub 2021 Sep 7. PMID: 34490477.

DOI: 10.3892/mmr.2021.12407

Zum Zeitpunkt der Abgabe dieser Dissertation im Peer-Review-Prozess befindlich; zum Zeitpunkt der Disputation angenommen im Journal Molecular Medicine Reports.