

Aus der Klinik der Inneren Medizin I  
Onkologie, Hämatologie, Klinische Immunologie und Rheumatologie  
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar  
Direktor: Prof. Dr. Stephan Stilgenbauer

**Integrierung des DLBCL-spezifischen B-Zell Rezeptor Antigens ARS2  
in Fab- und IgG1- Antikörper Therapieformate**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät**

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2021

vorgelegt von: Maximilian Maurice Kiefer  
geb. am 22.02.1997 in Merzig

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>I</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>IV</b>
<b>1. ZUSAMMENFASSUNG UND ABSTRACT</b>	<b>1</b>
1.1 INTEGRIERUNG DES DLBCL-SPEZIFISCHEN B-ZELL REZEPTOR ANTIGENS ARS2 IN FAB- UND IGG1- ANTIKÖRPER THERAPIEFORMATE	1
1.2 INTEGRATION OF THE DLBCL-SPECIFIC B-CELL RECEPTOR ANTIGEN ARS2 IN FAB- AND IGG1- ANTIBODY THERAPY FORMATS	2
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>4</b>
2.1 DAS IMMUNSYSTEM	4
2.1.1 <i>Antikörper-vermittelte Immunantwort</i>	4
2.1.1.1 Struktur und Aufbau von Antikörpern	5
2.1.1.2 Effektormechanismen	7
2.1.1.3 Monoklonale therapeutische Antikörper	9
2.2 DAS B-ZELL-LYMPHOM	11
2.2.1 <i>Entstehung von Neoplasien</i>	11
2.2.2 <i>B-Zellen und ihre Reifung</i>	11
2.2.3 <i>Einteilung und Klassifikation der Lymphome</i>	14
2.2.3.1 Klassifikation	14
2.2.3.2 Subklassifikationen	14
2.2.3.3 Klinische Klassifikation und prognostische Indices	15
2.2.4 <i>Lymphomentstehung</i>	16
2.2.4.1 Infektionen	16
2.2.4.2 Genetische Aberrationen	16
2.2.4.3 Chronische Antigenstimulation	18
2.2.5 <i>DLBCL Therapie</i>	18
2.2.5.1 Erstlinientherapie	19
2.2.5.2 Therapie bei Progress, Refraktärität und Rezidiv	20
2.2.5.3 Weitere therapeutische Optionen	22
2.3 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	27
2.3.1 <i>Antigen und Zelllinie</i>	28
2.3.2 <i>Fab Konstrukte</i>	28
2.3.3 <i>Schwerketten-Konstrukte</i>	30
2.3.4 <i>Antikörper Konstrukte</i>	31
<b>3. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>33</b>
3.1 MATERIAL	33
3.1.1 <i>Laborgeräte</i>	33
3.1.2 <i>Verbrauchsmaterialien</i>	33
3.1.2.1 Chemikalien und Sonstiges	33
3.1.2.2 Puffer, Lösungen und Ähnliches	37
3.1.2.3 Kits	39
3.1.3 <i>Zellen/Bakterien</i>	40
3.1.3.1 Zellen	40
3.1.3.2 Bakterien	40
3.1.4 <i>DNA</i>	41
3.1.4.1 Primer	41
3.1.4.2 Vektoren	42
3.1.4.3 Längenmarker	49
3.1.5 <i>Enzyme</i>	51
3.1.6 <i>Antikörper</i>	52
3.2 METHODEN	52
3.2.1 <i>Polymerasekettenreaktion (PCR)</i>	52
3.2.1.1 PCR zum Einfügen spezifischer Schnittstellen	53
3.2.1.2 Kolonien PCR	54

3.2.2 Agarose-Gelelektrophorese	55
3.2.3 Vermehrung von Bakterien in Flüssigkulturen	56
3.2.4 Transformation von Plasmiden in Bakterien	56
3.2.5 Methoden zur Isolation von DNA	57
3.2.5.1 Isolierung von Plasmid-DNA durch Minipräparation	57
3.2.5.2 Isolierung von Plasmid-DNA durch Midipräparation	57
3.2.5.3 Isolierung geschnittener DNA	57
3.2.6 Photometrische Methoden	57
3.2.6.1 Konzentrationsbestimmung von DNA	57
3.2.6.2 Konzentrationsbestimmung von Protein	58
3.2.7 Klonierungsprozeduren	58
3.2.7.1 Ligation des pCR 2.1 Vektors (TA Vektor)	59
3.2.7.2 Reaktion von DNA mit Restriktionsendonukleasen	60
3.2.7.3 Auftrennung geschnittener Insert-DNA oder Vektor-DNA mit Hilfe eines Agarose Gels	60
3.2.7.4 Vorbereiten der Vektor-DNA auf die Ligation mittels FastAP	61
3.2.7.5 Ligation	61
3.2.7.6 Selbstligation	62
3.2.7.7 Mutagenese	63
3.2.8 Zellkultur	64
3.2.8.1 Kultivierung	64
3.2.8.2 Zellzahl Bestimmung	64
3.2.8.3 Transfektion	65
3.2.8.4 Isolation und Kultivierung von PBMC's	65
3.2.9 Proteinanalytische Methoden	66
3.2.9.1 Induktion	66
3.2.9.2 Vorbereitung TALON beads	67
3.2.9.3 Vorbereitung Anti-FLAG Matrix	67
3.2.9.4 Isolation von Protein mit Polyhistidin-Tag (His-Tag)	67
3.2.9.5 Isolation von Protein mit FLAG-Tag	68
3.2.9.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	69
3.2.9.7 Western Blot	70
3.2.9.8 Immunfärbung von PVDF Membranen	70
3.2.9.9 Konzentrierung von Protein in Lösung	71
3.2.10 Durchflusszytometrische Analysen	72
3.2.10.1 Immunfärbung von Zellen vorbereitend zur Durchflusszytometrie	72
3.2.10.2 Durchflusszytometrie (FACS)	74
3.2.11 LDH Zytotoxizitäts Assay	76
3.2.12 Sequenzierung von DNA	77
<b>4. ERGEBNISSE</b>	<b>77</b>
4.1 BAR-FAB KONSTRUKTE	77
4.1.1 PCR zur Amplifikation der spezifischen Schnittstellen	78
4.1.2 Klonierung der BAR-Fab Konstrukte	79
4.1.2.1 TA-Klonierung der PCR Produkte	79
4.1.2.2 Klonierung der Schwerekette	81
4.1.2.3 Klonierung der Leichtkette	84
4.1.3 Expression der BAR-Fab Konstrukte	87
4.1.3.1 Induktion und Proteinisolation	87
4.1.3.2 Western Blot und Immunfärbung	88
4.1.4 Oberflächenfärbung zur Kontrolle der Bindung	89
4.2 BAR-FAB-ETA KONSTRUKT	91
4.2.1 Klonierung der BAR-Fab-ETA Konstrukte	91
4.2.2 Expression der BAR-Fab-ETA und -ETA-KDEL Konstrukte	94
4.2.2.1 Induktion und Proteinisolation	94
4.2.2.2 Western Blot und Immunfärbung	94
4.2.3 Oberflächenfärbung zur Kontrolle der Bindung	95
4.2.4 Zytotoxizitäts Analyse	97
4.2.5 Oberflächenfärbung zur Kontrolle der Bindung und Internalisierung	98
4.2.6 Intrazellulärfärbung zur Kontrolle der Internalisierung	101
4.3 BAR-SCHWERKETTEN UND BAR-SCHWERKETTEN-ETA KONSTRUKTE	102
4.3.1 Klonierung der BAR-Schwerketten Konstrukte	103

4.3.2 Expression der BAR-Schwerketten Konstrukte	105
4.3.2.1 Induktion und Proteinisolation	105
4.3.2.2 Western Blot und Immunfärbung	106
4.3.3 Oberflächenfärbung zur Kontrolle der Bindung	106
4.3.4 Intrazellulärfärbung zur Kontrolle der Internalisierung	107
4.3.5 Zytotoxizitätsassay	108
4.4 BAR ANTIKÖRPER	109
4.4.1 PCR zur Amplifikation spezifischer Schnittstellen	110
4.4.2 Klonierung des BAR Antikörpers	112
4.4.2.1 TA Klonierung der PCR Produkte	112
4.4.2.2 Mutagenesen	113
4.4.2.3 Klonierung der Schwerkette	116
4.4.2.4 Klonierung der Leichtkette	118
4.4.2.5 pSfi-FLAG Klonierung	120
4.4.3 Transfektion des BAR Antikörpers	122
4.4.4 Kultivierung der Zellen und Produktion des BAR Antikörpers	124
4.4.5 Proteinisolation	125
4.4.6 Oberflächenfärbung zur Kontrolle der Bindung	126
4.4.7 Proteinanreicherung und Isolation	128
4.4.8 Zytotoxizitätsassay	129
<b>5. DISKUSSION</b>	<b>131</b>
5.1 INTERPRETATION DER ERGEBNISSE	131
5.1.1 BAR Fab Konstrukt	131
5.1.2 BAR Fab-ETA Konstrukt	132
5.1.3 BAR Schwerketten-ETA Konstrukt	132
5.1.4 BAR Antikörper Konstrukt	132
5.2 VERGLEICH VERSCHIEDENER KONSTRUKTE	134
5.2.1 Pharmakokinetik	134
5.2.1.1 Elimination	134
5.2.1.2 Gewebepenetration	135
5.2.1.3 Aggregation	135
5.2.1.4 Immunisierung	136
5.2.2 Herstellung	137
5.2.2.1 Fab- und Schwerketten-Konstrukte	137
5.2.2.2 Antikörper	137
5.3 DLBCL THERAPIEKONZEPTE IM VERGLEICH	137
5.3.1 Nebenwirkungen der etablierten Therapiekonzepte	137
5.3.1.1 Nebenwirkungen der Immunchemotherapie	138
5.3.1.2 Nebenwirkungen der Stammzelltransplantation	138
5.3.1.3 Nebenwirkungen der CAR T-Zell Therapie	139
5.3.2 Mögliche Vorteile der BAR Konstrukte	139
5.3.2.1 Spezifische Toxizität	139
5.3.2.2 Günstiges Nebenwirkungsprofil	140
5.3.2.3 Möglichkeit der Therapie alter und/oder vorerkrankter Patienten	140
5.4 EIN AUSBLICK	141
5.4.1 Andere BAR Konstrukte	141
5.4.1.1 Bispezifische Konstrukte und Single Chain Konstrukte	141
5.4.2 Potenzial der untersuchten BAR Konstrukte dieser Arbeit	142
5.4.2.1 BAR Fab-Konstrukt	142
5.4.2.2 BAR Fab-ETA-Konstrukt	142
5.4.2.3 BAR Schwerketten-ETA-Konstrukt	143
5.4.2.4 BAR Antikörper Konstrukt	144
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>145</b>
<b>7. PUBLIKATIONEN/DANKSAGUNG</b>	<b>159</b>
7.1 PUBLIKATIONEN	159
7.2 DANKSAGUNG	160
<b>8. LEBENS LAUF</b>	<b>161</b>

# Abkürzungsverzeichnis

A	<i>Adenin</i>
AA	<i>Aminosäuren</i>
ABC	<i>activated b-cell</i>
ADC	<i>antibody-drug conjugate</i>
ADCC	<i>antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i>
AICD	<i>activation-induced cell death in b-lymphocytes</i>
ALL	<i>Akute Lymphatische Leukämie</i>
ARS2	<i>arsenite resistance protein 2</i>
BAR	<i>B-cell receptor antigens for reverse targeting</i>
BCR	<i>B-Zell Rezeptor</i>
BiTE	<i>Bi-specific T-cell engager</i>
bp	<i>Basenpaare</i>
C	<i>Cytosin</i>
CAR	<i>chimeric antigen receptor</i>
CDC	<i>complement dependent cytotoxicity</i>
CDR	<i>complementarity determining region</i>
C <sub>H</sub>	<i>konstante Domäne Schwereketten</i>
C <sub>L</sub>	<i>konstante Domäne Leichtketten</i>
CLL	<i>Chronische lymphatische Leukämie</i>
COO	<i>cell of origin</i>
CRES	<i>CAR related encephalopathy syndrome</i>
CRS	<i>Cytokine Release Syndrom</i>
C-Terminus	<i>Carboxy-Terminus</i>
CTLA-4	<i>cytotoxic lymphocyte associated protein 4</i>
DCD	<i>direct cell death</i>
DLBCL	<i>diffus großzelliges B-Zell Lymphom</i>
DNA	<i>Desoxyribonukleinsäure</i>
EBV	<i>Epstein-Barr-Virus</i>
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
Eppi	<i>Eppendorfgesäß</i>
Fab-Fragment	<i>fragment antigen binding Fragment</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FcRn	<i>neonataler Fc-gamma Rezeptor</i>
FR	<i>framework region</i>
FSC	<i>forward scatter</i>
G	<i>Guanin</i>
GC	<i>germinal center</i>
GCB	<i>germinal center b-cell</i>
HGBL	<i>High-grade B-cell Lymphoma</i>
His-tag	<i>Hexahistidin-tag</i>
ICANS	<i>immune effector cell-associated neurotoxicity syndrome</i>
Ig	<i>Immunglobulin</i>
IMiD	<i>Immunomodulatory Drug</i>
IPI	<i>International Prognostic Index</i>
IPTG	<i>Isopropylthiogalactosid</i>
kDa	<i>kilo Dalton</i>
LDH	<i>Laktatdehydrogenase</i>
MAK	<i>Membran-Angriffskomplex</i>
MALT	<i>mucosa associated lymphoid tissue</i>
MAX	<i>Maximum</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MIN	<i>Minimum</i>
MMAE	<i>Monomethyl Auristatin E</i>

NCCN	<i>National Comprehensive Cancer Network</i>
NHL	<i>Non-Hodgkin Lymphom</i>
NK-Zellen	<i>Natürliche Killer - Zellen</i>
NOS	<i>not otherwise specified</i>
NRM	<i>non-relapsed mortality</i>
N-Terminus	<i>Amino-Terminus</i>
PBMCs	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PCR	<i>Polymerasekettenreaktion</i>
PD-1	<i>programmed cell death protein 1</i>
PEG	<i>Polyethylenglykol</i>
PET	<i>Positronen-Emissions-Tomographie</i>
PFA	<i>Paraformaldehyd</i>
PMBCL	<i>Primär Mediastinale B-Zell Lymphom</i>
PMLBL	<i>Primär Mediastinales Großzelliges B-Zell Lymphom</i>
PTLD	<i>post-transplant lymphoproliferative disorder</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
scFv	<i>single-chain fragment variable</i>
SDS	<i>Natriumdodecylsulfat</i>
SSC	<i>side scatter</i>
T	<i>Thymin</i>
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TMDD	<i>target-mediated drug disposition model</i>
TRUCK	<i>T-cell redirected for universal cytokin killing</i>
V <sub>H</sub>	<i>variable Domäne Schwerkette</i>
V <sub>L</sub>	<i>variable Domäne Leichtkette</i>

# 1. Zusammenfassung und Abstract

## 1.1 Integrierung des DLBCL-spezifischen B-Zell Rezeptor Antigens ARS2 in Fab- und IgG1- Antikörper Therapieformate

Ziel der Arbeit war es, unterschiedliche Antikörper oder antikörperähnlichen Konstrukte zu entwickeln, die auf der Grundlage des BAR (B-cell receptor antigens for reverse targeting)-Konzepts spezifisch diffus großzellige B-Zell Lymphome (DLBCL) binden und diese zerstören können.

Das BAR-Konzept basiert auf der spezifischen Bindung von Autoantigenen an die B-Zell Rezeptoren (BCR) der Lymphomzelllinien. In dieser Arbeit wurde das arsenite resistance protein 2 (ARS2) als Autoantigen verwendet, welches spezifisch den B-Zell Rezeptor von diffus großzelligem B-Zell Lymphomen vom activated b-cell type (ABC-Typ) bindet.

Zunächst wurden drei Fab-Konstrukte mit unterschiedlichen Ausschnitten der ARS2 Sequenz an Stelle der variablen Domänen der Leicht- und Schwereketten in einen pCES-1 Vektor kloniert. Dieser wurde anschließend in Bakterien transformiert. Nach erfolgreicher Expression und anschließender Isolation der Konstrukte mit Hilfe des Histidin (His)-Tags, was durch eine Western Blot Analyse bestätigt werden konnte, wurde mittels Durchflusszytometrie die Bindung auf diffus großzelligem B-Zell Lymphom Zelllinien überprüft. Das Fab-Konstrukt mit den ARS2 Aminosäuren (AA) 343-466 konnte erfolgreich und spezifisch auf der U2932 Zelllinie binden.

Im nächsten Schritt wurde dieses Konstrukt an ein Toxin, in diesem Fall das ETA-Toxin, gekoppelt. Dazu wurde die für das Fab-Konstrukt codierende Sequenz ausgeschnitten und in einen pCES-1 Vektor kloniert, der das ETA-Toxin bereits beinhaltet. Anschließend konnte der Vektor erfolgreich in Bakterien transformiert werden. Das Konstrukt konnte nun erfolgreich exprimiert und mithilfe des Histidin-Tags isoliert werden, was mittels Western Blot Analyse bestätigt werden konnte. Nach durchflusszytometrischer Bestätigung der erfolgreichen Bindung auf den U2932 Zellen, wurde zur Untersuchung der Zytotoxizität ein Laktatdehydrogenase (LDH)-Zytotoxizitätsassay durchgeführt. Es konnte keine spezifische Lyse detektiert werden. In einer anschließenden durchflusszytometrischen Untersuchung konnte gezeigt werden, dass es zu keiner Internalisierung des BAR Fab-ETA Konstrukts durch die Zellen gekommen ist.

Als weiteres Therapieformat wurde nun ein BAR Schwereketten-Konstrukt, welches aus der konstanten Domäne 1 der Schwerekette, der ARS2 Domäne (AA 343-466) und der ETA-Sequenz besteht, konstruiert. Dazu wurde die leichte Kette aus dem pCES-1 Vektor, der für das Fab-ETA-Konstrukt codiert, herausgeschnitten. Anschließend wurde der Vektor in Bakterien transformiert, das Konstrukt erfolgreich exprimiert und mithilfe des Histidin-Tags isoliert, was wiederum durch eine Western Blot Analyse bestätigt werden konnte. Durchflusszytometrisch konnte zunächst die Bindung auf den U2932

Zellen gezeigt werden. Im Anschluss konnte ebenfalls die Internalisierung durch die Zellen durchflusszytometrisch bestätigt werden. Mit Hilfe des LDH-Zytotoxizitätsassay konnte nun eine spezifische Lyse auf den U2932 Zellen detektiert werden.

Schließlich wurde nun ein BAR-Antikörper im Sinne eines vollständigen IgG1 Antikörpers mit zwei ARS2 Domänen (AA 343-466), anstelle der variablen Domänen konstruiert. Zunächst wurden die passenden Sequenzen für das ARS2 und für die Leicht- und Schwereketten in einen TA-Vektor kloniert. Darauffolgend wurde nun die codierende Sequenz als Ganzes in einen pSfi-FLAG-Vektor kloniert. Dieser wurde dann in HEK-293T Zellen transfiziert. Das Konstrukt konnte anschließend exprimiert werden und erfolgreich mithilfe des FLAG-Tags isoliert werden, was durch eine Western Blot Analyse validiert werden konnte. Nun konnte im Anschluss durchflusszytometrisch gezeigt werden, dass der BAR-Antikörper erfolgreich und spezifisch auf den U2932 Zellen bindet. Mit Hilfe des LDH-Zytotoxizitätsassay konnte ohne zugegebene Effektorzellen auf den U2932 Zellen eine spezifische Lyse von 19% bei einer Konstruktkonzentration von 0,5 µg/ml ermittelt werden. Mit hinzugegebenen Effektorzellen, in diesem Fall peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), kam es auf den U2932 Zellen zu einer spezifischen Lyse von 86% bei einer Konstruktkonzentration von 1 µg/ml.

## **1.2 Integration of the DLBCL-specific B-cell receptor antigen ARS2 in Fab- and IgG1- antibody therapy formats**

The aim of the thesis was to design different types of antibodies or antibody-like constructs based on the B-cell receptor antigens for reverse targeting (BAR) concept, which are able to bind to and to destroy diffuse large cell B-cell lymphoma (DLBCL) cells specifically. The B-cell receptor antigens for reverse targeting concept is based on the specific binding of autoantigens to their B-cell receptor (BCR) on lymphoma cells. In this thesis we worked with the arsenite resistance protein 2 (ARS2) which binds to diffuse large B-cell lymphoma from the activated B-cell type (ABC-type) specifically.

First, we designed three different Fab-constructs with different sections of the ARS2 protein at the place of the variable regions of the light and heavy chain. The sequences were cloned into a pCES-1 vector. Next the vector was transformed into bacteria. In the next step the construct was expressed and isolated successfully with the help of the histidine (his)-tag. This was confirmed by a western blot analysis. Now flow cytometry was used to verify the binding of the three constructs to the U2932 cell line. The Fab-construct with the aminoacids (AA) 343-466 could bind to the U2932 cells successfully.

The next step was to link the Fab-construct to a toxin, in this case the ETA-toxin. Therefore, the Fab-construct coding sequence was cloned into a pCES-1 vector containing the ETA-toxin sequence. After transformation into bacteria the construct could be expressed and isolated with the help of the histidine-tag, which was proved by western blot analysis. After confirming the binding of the BAR Fab-ETA-construct to the U2932 cells by flow cytometry, the lactatdehydrogenase (LDH)-cytotoxicity assay was accomplished to look for the specific cytotoxicity of the construct. There was not any specific

cytotoxicity on the U2932 cells. A following flow cytometry demonstrated that the construct has not been internalized by the cells.

The next build construct was a BAR heavy chain construct, which contains of the constant domain 1 of the heavy chain, the ars2 sequence (AA 343-466) and the ETA sequence. To build that construct, the light chain was cut out of the pCES-1 vector who coded for the fab-ETA-construct. Subsequently the vector was transformed into bacteria and the construct was expressed and isolated successfully with the help of the histidine-tag. That could be proved by a western blot analysis. Afterwards, the binding to the U2932 cells and also the internalization could be shown by two different flow cytometric analysis. Now a specifical lysis on the U2932 cells could be recognized by the LDH cytotoxicity assay.

Finally, we built a BAR antibody in the meaning of a IgG1 antibody with two ARS2 domains at the place of the variable domains. First, the sequences for the ARS2 and for the light and heavy chains were cloned into a TA vector. Next the whole coding sequence was cloned into a pSfi-FLAG vector, which was transfected into HEK-293T cells then. Afterwards, the construct could be expressed and isolated successfully with the help of the FLAG-tag. This fact was proved by western blot analysis. Now in the flow cytometry the binding of the antibody construct to the U2932 cells was confirmed. The LDH-cytotoxicity assay has come to the result that without addition of effector cells the specific lysis is maximum 19% by a construct concentration of 5 µg/ml. With addition of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) as effector cells, there could be detected a specific lysis of maximum 86 % by a construct concentration of 1 µg/ml at the U2932 cells.

## **2. Einleitung**

### **2.1 Das Immunsystem**

Das Immunsystem bezeichnet ein äußerst komplexes System aus humoralen sowie zellulären Bestandteilen, die den Körper in die Lage versetzen, sich mit Infektionen, körperfremden Strukturen, aber auch Tumoren und Vielem mehr auseinanderzusetzen.

Dieses System lässt sich nach der Beschaffenheit der Komponenten in zellulär und humoral (löslich) einteilen.

Zelluläre Komponenten sind dabei die B- und T-Lymphozyten, die Granulozyten, die Makrophagen, die aus den Monozyten hervorgehen, die dendritischen Zellen und die Natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen).

Zu den humoralen Komponenten werden Antikörper, Komplementfaktoren, aber auch Interleukine gezählt. Ebenfalls zu beachten sind Oberflächenbarrieren als Teil des Immunsystems, wie zum Beispiel die Haut, die keiner der beiden oben genannten Gruppen eindeutig zuzuordnen sind.

Das Immunsystem kann jedoch auch unter dem Gesichtspunkt der Spezifität in unspezifisch und spezifisch unterteilt werden.

Unspezifische Teile sind dabei die Granulozyten, die Makrophagen, teilweise das Komplementsystem oder die NK-Zellen, die eben nicht spezifisch gegen ein bestimmtes Antigen gerichtet sind, sondern die sich allgemeiner gegen unspezifische Merkmale richten, zum Beispiel mit Hilfe des toll-like receptor (TLR).

Spezifisch dagegen sind die B-Lymphozyten, die Antikörper oder auch die zuvor aktivierten zytotoxischen T-Zellen, die zielgenau gegen jeweils ein Antigen gerichtet sind.

#### **2.1.1 Antikörper-vermittelte Immunantwort**

Wie zuvor bereits erwähnt handelt es sich bei Immunglobulinen (Ig), die auch Antikörper genannt werden, also um einen humoralen sowie auch spezifischen Teil des Immunsystems. Die Antikörper werden maßgeblich von Plasmazellen produziert, die aus den reifen B-Zellen hervorgehen. Die Aufgaben der Immunglobuline sind ebenso vielfältig wie ihre Funktionen. Unter anderem dadurch bedingt gibt es auch unterschiedliche Typen von Antikörpern, die für unterschiedliche Aufgaben mehr oder minder qualifiziert sind. Man differenziert zunächst verschiedene Klassen der humanen Immunglobuline die sich in Struktur sowie Funktion unterscheiden. Differenziert werden IgA, IgD, IgE, IgG und IgM.

### 2.1.1.1 Struktur und Aufbau von Antikörpern

Die allgemeine Struktur eines humanen Immunglobulins richtet sich nach seiner Klasse. So besitzen die schweren Ketten des Immunglobulin M beispielsweise eine zusätzliche konstante Domäne. Hier soll nun die Struktur am Beispiel eines IgG erläutert werden, da diese Klasse für die diesige Arbeit von besonderem Interesse ist.

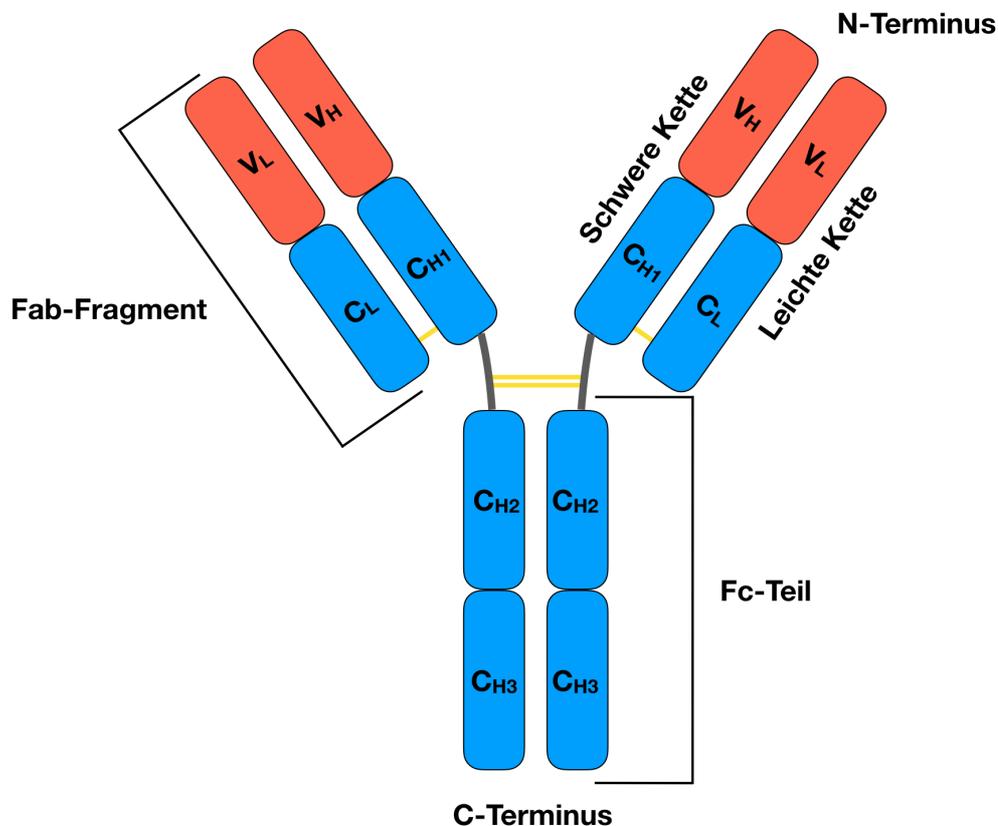
Bei dem Immunglobulin G Molekül handelt es sich um ein Protein mit einem Molekulargewicht von circa 150 kilodalton (kDa). Es besteht aus zwei identischen schweren Ketten (heavy chains), beim IgG als schwere Kette vom Typ gamma bezeichnet, sowie zwei identischen leichten Ketten (light chains). Die schweren Ketten für die anderen Antikörperklassen sind, entsprechend ihrer Bezeichnung, bei der Klasse IgA vom Typ alpha, bei der Klasse IgD vom Typ delta, bei der Klasse IgM vom Typ mu und bei der Klasse IgE vom Typ epsilon.

Insgesamt existieren wiederum vier verschiedene isotypische Subklassen der Schwereketten vom Typ gamma und damit des Immunglobulins der Klasse IgG (IgG1-4). Die zwei leichten Ketten liegen entweder als paarige Kappa-Ketten oder Lambda-Ketten vor. Bei Menschen ist das Verhältnis von kappa zu lambda normwertig zwischen 0,26 und 1,65 [86]. Jeweils eine der schweren Ketten paart sich mit einer der leichten Ketten, indem sie über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Die beiden schweren Ketten sind ebenfalls miteinander in der sogenannten hinge-Region (Scharnierregion), ebenfalls über zwei Disulfidbrücken, miteinander verbunden.

In den einzelnen Ketten werden konstante von variablen Domänen unterschieden. Jede dieser einzelnen Domänen besteht jeweils aus ungefähr 110 Aminosäuren (AA). Leichte Ketten sowie auch schwere Ketten besitzen jeweils eine variable Domäne ( $V_L$  beziehungsweise  $V_H$ ). Die leichten Ketten besitzen dann jeweils noch eine konstante Domäne ( $C_L$ ), wohingegen die schweren Ketten des IgG drei weitere konstante Domänen besitzen ( $C_{H1-3}$ ). Die variablen Domänen bilden den Amino-Terminus (N-Terminus) des Antikörpers wohingegen die konstanten Domänen den Carboxy-Terminus (C-Terminus) des Antikörpers bilden. Je nachdem, ob der C-Terminus hydrophil oder hydrophob ist, handelt es sich um einen löslichen oder membrangebundenen Antikörper [138].

Zudem unterscheidet man zwei verschiedene Teile des IgG. Einmal den Fc-Teil, der klassenspezifisch ist und nur aus konstanten Domänen besteht. Dieser Teil ist auch mehr oder weniger für die Funktionalität des Antikörpers verantwortlich (Opsonisierung, Membranständigkeit, Plazentagängigkeit).

Den anderen Teil des Antikörpers bilden die zwei sogenannten fragment antigen binding Fragmente (Fab-Fragmente), die jeweils aus den variablen Domänen der Leicht- und Schwereketten sowie der ersten konstanten Domäne der beiden Ketten bestehen. Sie sind maßgeblich für die Antigenbindung verantwortlich.

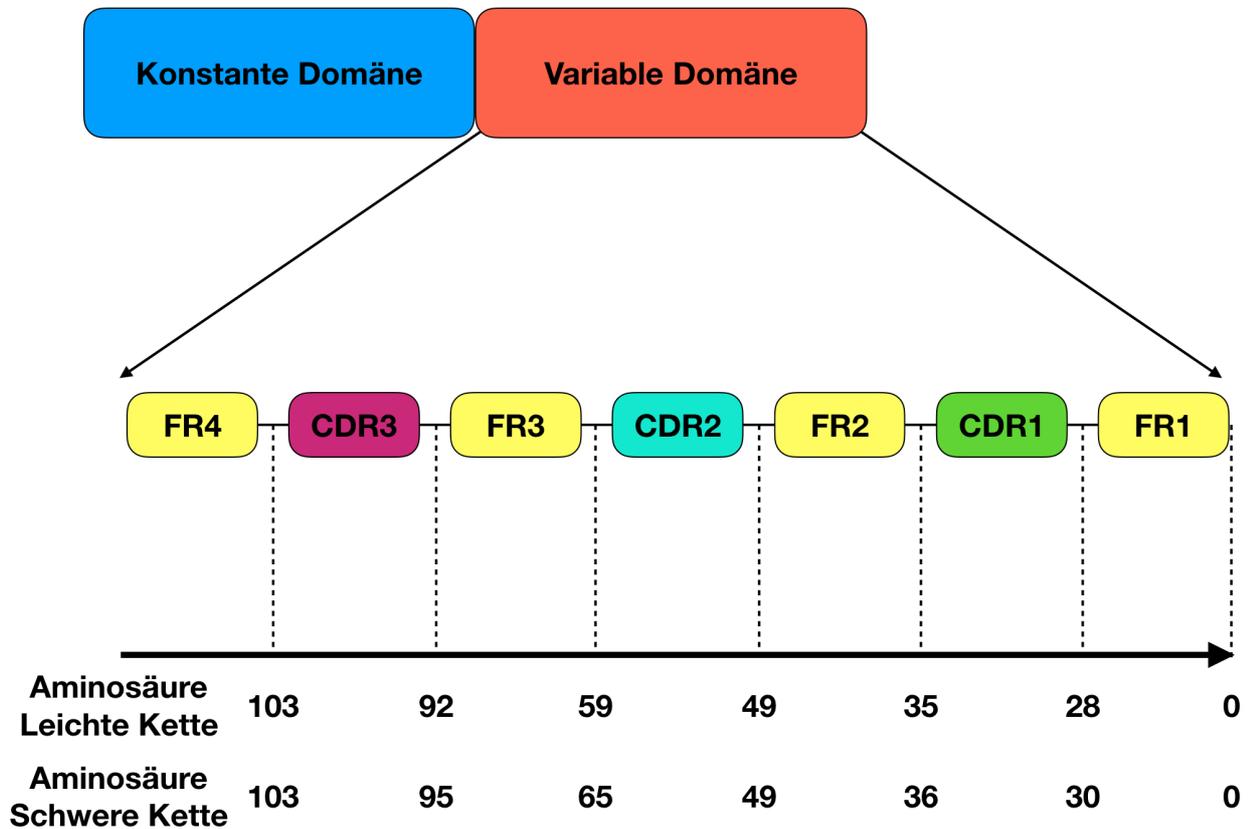


**Abbildung 1: Schematische Darstellung IgG-Antikörper**

Die Abbildung zeigt einen Antikörper der IgG Klasse. Zu erkennen ist am unteren Ende der Fc-Teil mit dem C-Terminus und den konstanten Domänen zwei und drei der zwei schweren Ketten ( $C_{H2}$  und  $C_{H3}$ ). Direkt darüber ist die hinge-Region mit den dazugehörigen zwei Disulfid-Brücken (gelb) zu erkennen. Am oberen Ende findet sich links und rechts jeweils ein Fab-Fragment bestehend aus der leichten Kette mit variabler ( $V_L$ ) und konstanter ( $C_L$ ) Domäne sowie dem oberen Teil der schweren Kette bestehend aus variabler Domäne ( $V_H$ ) und der ersten konstanten Domäne ( $C_{H1}$ ). Innerhalb des Fab-Fragments werden die schwere und die leichte Kette ebenfalls durch eine Disulfidbrücke (gelb) miteinander verbunden. Der N-Terminus definiert das obere Ende des Fab-Fragments.

Die variablen Domänen können in drei Regionen besonders großer Variabilität und vier Regionen, die eher der Strukturgebung dienen, unterteilt werden. Die drei hypervariablen Regionen werden als complementarity determining regions (CDR) bezeichnet, wobei die CDR3 nochmals variabler als die CDR1 und die CDR2 ist. Sie befinden sich in der Schwere Kette ungefähr zwischen den Aminosäuren 30-36 (CDR1), 49-65 (CDR2) und 95-103 (CDR3), sowie in der Leichtkette ungefähr zwischen den Aminosäuren 28-35 (CDR1), 49-59 (CDR2) und 92-103 (CDR3). Die strukturegebenden Regionen werden auch als framework regions (FR) bezeichnet, von denen es jeweils vier Verschiedene gibt (FR1-4). Die FR's bilden vorwiegend beta-Faltblatt Strukturen, aus denen die CDR's dann als Schleifen herausragen. Meist kommen die insgesamt 6 CDR's der 2 Ketten eines Fab-Fragments sich auch räumlich nah und bilden dann zusammen die Antigenbindestelle des jeweiligen Fab-Fragments [114].

Wie genau es zu unterschiedlichen variablen Domänen kommt, wird nachfolgend in Zusammenhang mit der B-Zell Reifung erläutert.



**Abbildung 2: Schematische Darstellung einer variablen Domäne**

Die Abbildung stellt eine variable Domäne (leichte oder schwere Kette) schematisch dar. Zu erkennen sind in Gelb die vier framework regions (FR1-4). Dazwischen finden sich die drei complementarity determining regions CDR1 (grün), CDR2 (türkis) und CDR3 (lila). Darunter findet sich eine Angabe über die Position der einzelnen Regionen in Bezug auf die Aminosäuren. Rechts markiert der Pfeil den N-Terminus, links findet sich der C-Terminus. Die Angaben unterscheiden sich für leichte und schwere Kette voneinander.

### 2.1.1.2 Effektormechanismen

Die Funktion eines Antikörpers ist maßgeblich von seiner Struktur, insbesondere von seinem Fc-Teil, bestehend aus konstanten Domänen, abhängig. Dadurch bedingt, unterscheiden sich die verschiedenen Antikörperklassen deutlich in der Ausprägung ihrer Funktionalität. Nachfolgend sind die Effektormechanismen, der durch Antikörper vermittelten Immunantwort, beschrieben.

#### Neutralisierung

Bei der Neutralisierung binden Antikörper ihre spezifischen Antigene (zum Beispiel Toxine) und verhindern somit die Pathogenität dieser. Dies geschieht beispielsweise durch Bindung und

Abschirmung einer für die Pathogenität benötigten Region des Antigens. Dementsprechend ist hier keine weitere Zelle nötig.

### **Opsonisierung und antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC)**

Die Opsonisierung beschreibt die Fähigkeit eines Antikörpers, sein gebundenes Antigen anderen Zellen quasi zu präsentieren. Dieser Vorgang wird maßgeblich über den Fc-Teil der Antikörper vermittelt und führt auf Zellen mit entsprechenden Fc-Rezeptoren zu einer Interaktion und daraus folgend beispielsweise zu einer zytotoxischen Reaktion durch Makrophagen, Granulozyten oder NK-Zellen. Verschiedene Zellen exprimieren dabei unterschiedliche Klassen von Fc-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche, die entsprechend auch die verschiedenen Fc-Teile der Antikörperklassen unterschiedlich binden und mit ihnen unterschiedlich interagieren. NK-Zellen tragen auf ihrer Oberfläche den FcγRIII-Rezeptor (CD16) der die Fc-Teile von IgG1 und IgG3 bindet. Es kommt zur Interaktion zwischen der NK-Zelle und der Antikörper-gebundenen Zelle und letztendlich zur Lyse der Zelle, unter anderem auch durch Freisetzung cytoplasmatischer Granula mit Perforinen und Granzymen. Man spricht bei diesem NK-Zell vermittelten Vorgang von der antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, kurz der ADCC [7,30]. Die ADCC stellt somit quasi eine Verbindung zwischen spezifischem und unspezifischem Teil des Immunsystems dar.

### **complement dependent cytotoxicity (CDC)**

Eine weitere zentrale Funktion von Antikörpern besteht in der Aktivierung des Komplementsystems. Das Komplementsystem kann auch ohne das Vorhandensein von Antikörpern über den sogenannten Lektinweg aktiviert werden. Antikörperabhängig erfolgt die Aktivierung über den klassischen Weg. Zunächst erfolgt eine Bindung des spezifischen Antigens über die variable Domäne. Durch den Fc-Teil des Antikörpers kommt es nun zu einer Aktivierung einer Kaskade an Komplementfaktoren, beginnend mit dem Faktor C1. Nachfolgend wird der Faktor C3 aktiviert, was letztendlich zur Bildung des sogenannten Membran-Angriffskomplexes (MAK), bestehend aus C5b, C6, C7, C8 und C9 führt, der dann zur Zelllyse beiträgt. Auch hier wird keine weitere spezifische Zelle benötigt. Man nennt diesen Vorgang auch complement dependent cytotoxicity (CDC) [176].

Die CDC und die ADCC spielen beide ebenfalls eine zentrale Rolle in der Immuntherapie maligner Erkrankungen mit monoklonalen Antikörpern, wobei sich hierbei beide Mechanismen gegenseitig beeinflussen [138].

### **Sensibilisierung von Mastzellen**

Des Weiteren sind Antikörper dazu in der Lage, Mastzellen zu sensibilisieren. Hierbei binden die Antikörper (hauptsächlich der IgE Klasse) über ihren Fc-Teil entsprechende Fc-Rezeptoren auf

Mastzellen. Über eine Antigenbindung zweier räumlich verwandter Antikörper kommt es zu einer Quervernetzung und darauffolgend zu einer Mastzelldegranulation [115].

Der folgenden Abbildung ist zu entnehmen, inwieweit die Antikörper der verschiedenen Klassen zu den verschiedenen, beschriebenen Funktionen befähigt sind.

	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgM	IgA	IgE	IgD
Neutralisierung	++	++	++	++	+	++	-	-
Opsonisierung	++	*	++	+	+	+	-	-
Zerstörung durch NK-Zellen	++	-	++	-	-	-	-	-
Sensibilisierung von Mastzellen	+	-	+	-	-	-	+++	-
Komplement-Aktivierung	++	+	+++	-	+++	+	-	-

**Abbildung 3: Tabelle zur Funktionalität verschiedener Antikörper Klassen**

Die Tabelle zeigt das Potenzial der verschiedenen Antikörperklassen, unterschiedliche Funktionen auszuführen. In der obersten Zeile sind die verschiedenen Klassen aufgelistet. Die linke Spalte zeigt die verschiedenen Funktionen. Minus (-) gibt eine sehr geringe bis fehlende Funktionalität an. Die Ausprägung der Fähigkeit zur Funktion steigert sich von mittelmäßig (+) über stark ausgeprägt (++) bis hin zu sehr stark ausgeprägt (+++). \*IgG2 wirkt nur in Gegenwart eines entsprechenden Allotyps, den man bei einigen Menschen findet, als Opsonin.

### 2.1.1.3 Monoklonale therapeutische Antikörper

#### Monoklonale und polyklonale Antikörper

Unter monoklonalen Antikörpern versteht man solche, die von einer Zelllinie (Zellklon) ausgehend produziert werden und sich lediglich gegen ein einzelnes Epitop eines Antigens richten.

Zur Herstellung monoklonaler Antikörper wurde 1975 erstmalig die Hybridomtechnik entwickelt [90]. Dabei wurden zunächst Mäuse mit dem Antigen, gegen das der Antikörper gerichtet sein sollte, immunisiert. Die entstandenen produktiven B-Zellen wurden nun im Anschluss mit Myelomzellen fusioniert. Es entstanden Hybridomzellen, die dazu in der Lage sind, nahezu unbegrenzt monoklonale Antikörper zu produzieren.

Der erste monoklonale therapeutische Antikörper seiner Art war der gegen das Oberflächenantigen CD20 gerichtete Antikörper Rituximab, der zunächst zur Bekämpfung von refraktären, indolenten B-Zell Lymphomen zugelassen wurde [105,108]. Mittlerweile existiert eine Vielzahl an Zulassungen für das Rituximab für verschiedenste maligne und autoimmunogene Erkrankungen.

Im Gegensatz dazu steht die stets polyklonale, physiologische Immunantwort gegen Pathogene, die in den Körper eindringen. Hierbei produzieren eine Vielzahl von Plasmazellen verschiedene und somit polyklonale Antikörper, die gegen eine Vielzahl an Epitopen des Pathogens gerichtet sind.

### **Rekombinante Antikörper**

Rekombinante Antikörper werden durch gentechnologische Verfahren hergestellt. Die Herstellung beginnt zunächst mit der Klonierung der nötigen Gensequenzen in eigens für die Antikörperproduktion verwendeten Transfervektoren. Nach erfolgreicher Klonierung werden diese Vektoren nun anschließend in Expressionssysteme, entweder prokaryotischer oder eukaryotischer Art, transferiert. In den Expressionssystemen kommt es nun zur endgültigen Produktion der Antikörper.

Als Beispiel für einen therapeutisch verwendeten rekombinanten Antikörper lässt sich das Obinutuzumab nennen. Obinutuzumab wird zur Behandlung der nicht vorbehandelten chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) sowie des folliculären Lymphoms verwendet [106,122].

### **Therapeutische Wirkung**

Die Art und Weise, wie genau im Einzelnen therapeutische Antikörper wirken, ist äußerst komplex. Stark vereinfacht lässt sich sagen, dass es auf der einen Seite eine Wirkung über Fc-Rezeptor vermittelte Mechanismen gibt. Allen voran wären hier sicherlich die ADCC sowie die CDC zu nennen, die in unterschiedlich starker Ausprägung zur Zytotoxizität beitragen und sich auch gegenseitig beeinflussen. Auf der anderen Seite entfaltet sich in einem gewissen Ausmaß jedoch auch eine Wirkung über Fc-Rezeptor unabhängige Mechanismen, die als direkte Zell Zytotoxizität (direct cell death; DCD) oder direct cell killing bezeichnet wird [60]. In welchem Ausmaß nun welcher der Wirkungsmechanismen greift, hängt maßgeblich von der Struktur des Antikörpers ab.

### **Typ I und Typ II (Rituximab und Obinutuzumab)**

Vergleicht man Rituximab und Obinutuzumab miteinander, so zeigen sich deutliche Unterschiede, obwohl beide Antikörper gegen das gleiche Zielantigen, nämlich CD20, gerichtet sind.

Rituximab bezeichnet man auch als monoklonalen Antikörper vom Typ I. Obinutuzumab ist im Gegensatz dazu ein Beispiel für einen Typ II monoklonalen Antikörper. Man verändert hierbei posttranslational die Glykosylierung des Antikörpers. Im Falle von Obinutuzumab kommt es zur Entfernung von Fucose-Gruppen am Fc-Teil des Antikörpers. Durch diese strukturellen Unterschiede ergeben sich dann auch die verschiedenen starken Ausprägungen der Wirkung und Funktionalität. Obinutuzumab besitzt im Vergleich zu Rituximab ein größeres Potenzial für den direct cell death (DCD). Auch ist das Potenzial zur Einleitung der ADCC bei Obinutuzumab größer. Hingegen ist die Initiierung der CDC nicht so stark ausgeprägt wie bei Rituximab. Dies lässt sich auf die fehlenden

Fucose-Gruppen und die damit einhergehende andere Konfiguration während der CD20 Bindung zurückführen [55].

## **2.2 Das B-Zell-Lymphom**

### **2.2.1 Entstehung von Neoplasien**

Der Prozess der Zellteilung ist die Grundlage für die Evolution und das Überleben von Eukaryonten. Läuft dieser Prozess jedoch nicht so wie eigentlich vorgesehen ab, kann es zu einer klonalen Dysregulation und darauffolgend zu einer klonalen, autonomen Zellproliferation, einer sogenannten Neoplasie, kommen.

Die einzelnen Ereignisse, die letztendlich in ihrer Gesamtheit zur Entstehung einer Neoplasie führen, sind sehr komplex und vielfältig, sowie nach wie vor nicht vollständig im Einzelnen verstanden. Hannahan und Weinberg gelang es zehn sogenannte hallmarks of cancer zu definieren. Diese hallmarks sind Eigenschaften, die Neoplasien im Laufe ihrer Genese erlangen und die letztendlich auch ausschlaggebend für die Tumorgenese sind: die Unempfindlichkeit gegenüber Wachstums-Inhibition, die Vermeidung von Immunreaktionen, ein unlimitiertes Replikationspotenzial, eine stimulierende Entzündung, Gewebeinvasion und Metastasierung, fortwährende Angiogenese, genomische Instabilität und Mutation, Apoptose, Deregulation der zellulären Energiekontrolle, sowie die Proliferation [68].

Viele der zahlreichen und unterschiedlichen Tumorerkrankungen stellen für den Menschen ein erhebliches gesundheitliches Risiko dar. In Deutschland waren laut dem Statistischem Bundesamt im Jahre 2017 24,4% aller Todesfälle auf bösartige Neubildungen zurückzuführen, was somit nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste zum Tode führende Krankheitsentität ist.

### **2.2.2 B-Zellen und ihre Reifung**

In der Hämatologie/Onkologie widmet man sich unter anderem Tumorerkrankungen des Blut- und Lymphsystems, welche im Vergleich zu vielen anderen soliden Tumoren eine gewisse Sonderstellung einnehmen. Da sich die betroffenen Zellen teilweise im Blut zirkulierend vorfinden und nicht, wie bei vielen soliden Tumoren zunächst konzentriert und isoliert an einer Lokalität, verbietet sich zunächst oft ein primär operativer Therapieansatz. Daher war es nötig, andere Möglichkeiten in Erwägung zu ziehen, worauf später noch im Detail eingegangen wird.

Bei Betrachtung der zellulären Bestandteile des Blutes machen nach den Erythrozyten die Leukozyten den größten Anteil aus. Ein Viertel bis ein Drittel aller Leukozyten wird durch die Lymphozyten repräsentiert. Die Lymphozyten wiederum werden dann nochmals in B- und T-Lymphozyten unterteilt. Die B-Zellen machen hierbei zusammen mit den Antikörpern das zentrale Element der humoralen Abwehr des sogenannten spezifischen Immunsystems aus.

Schaut man sich den physiologischen B-Lymphozyten an, kann man mehrere Stadien der Reifung und Entwicklung von der hämatopoetischen Stammzelle im Knochenmark bis hin zum reifen B-Lymphozyten unterscheiden. Zwischen der B-Zell Reifung, der Reifung des dazugehörigen B-Zell-Rezeptors (BCR) in Form eines membranständigen Antikörpers und der Produktion von Antikörpern herrscht ein enger Zusammenhang, weswegen auch auf die entsprechenden Kapitel dazu verwiesen wird.

Das Grundprinzip der Antikörperentstehung und damit auch das Grundprinzip der genetischen Vielfalt an Antikörpern mit unterschiedlichen variablen Regionen zur Bindung verschiedenster Antigene, ist das Prinzip der somatischen Rekombination (rearrangement) mit sich daran anschließender somatischer Hypermutation. Beim rearrangement werden verschiedene Gensegmente (je nach Art der Kette unterschiedliche), von denen jeweils nur eine begrenzte Anzahl vorliegen, umgelagert. Dadurch vergrößert sich die Zahl der verschiedenen möglichen variablen Regionen bereits schon deutlich im Vergleich zu der Zahl der verschiedenen Gensegmente an sich. Der sich dann in der gereiften und aktivierten B-Zelle anschließende Prozess der somatischen Hypermutation, bei dem einzelne Basen in der DNA Struktur nochmals verändert werden und somit wiederum viele weitere unterschiedliche Gensequenzen entstehen können, vergrößert diese Zahl dann nochmals deutlich [166]. Sinn hiervon ist auch eine weitere Affinitätssteigerung der Antikörper, was folgend auch nochmals thematisiert wird [99].

Betreffen diese somatischen Hypermutationen jedoch nicht die Gene der variablen Domänen sondern andere Genloci, wie beispielsweise von Protoonkogenen oder Tumorsuppressoren (MYC, BCL2, BCL6 und andere), so kann es zur Entartung der Zellen kommen [126,152]. Im Einzelnen wird das später im Zuge der Klassifikation und Lymphomentstehung noch tiefergehender thematisiert.

Eines der ersten, von der pluripotenten, hämatopoetischen Stammzelle und der anschließend folgenden gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzelle abzugrenzende Stadium in der Reifung der B-Zelle, ist das der frühen Pro-B-Zelle. Hier kommt es zunächst zum rearrangement der D- und J-Gensegmente der Schwereketten. In einem zweiten Schritt kommt es dann, in der nun als späten Pro-B-Zelle bezeichneten Zelle, zum rearrangement der V-Gensegmente, die an die nun als DJ-Kassette bezeichneten Gensegmente der Schwereketten angrenzen. Ist dies abgeschlossen, befindet sich der 5' der V-Region gelegene Promotor so nah am 3' der J-Region gelegenen Enhancer, dass es zur Transkription, und bei Produktivität der Umlagerungen, zur Herstellung einer Schwereketten vom Typ IgM kommt. Diese Schwereketten werden dann zusammen mit einer Ersatz-Leichtkette (surrogate light chain) an die Zelloberfläche gebracht. Dieser Komplex auf der Zelloberfläche wird als Prä-BCR bezeichnet, was auch den Eintritt der Zelle in das Stadium der Prä-B-Zelle definiert. Hier kommt es nun zum rearrangement der V- und J-Gensegmente der Leichtketten, entweder einer kappa oder einer lambda Leichtkette. Die fertige Leichtkette wird dann an die Zelloberfläche an Stelle der surrogate light chain gebracht.

Die Zelle hat damit das nächste Stadium erreicht. Man spricht nun von der unreifen B-Zelle. In diesem Stadium besitzt die Zelle bereits einen BCR in Form eines Antikörpers vom IgM-Typ, bestehend aus schwerer und leichter Kette [27]. Die unreife B-Zelle, die sich zu diesem Zeitpunkt noch immer im Knochenmark befindet, durchläuft nun den Prozess der zentralen B-Zell-Toleranz (im Unterschied zur peripheren B-Zell-Toleranz, die in der Peripherie stattfindet). Hierbei wird überprüft, ob der B-Zell-Rezeptor körpereigene Antigene bindet. Ist dies der Fall, wird die Zelle in Apoptose gehen. Man spricht hier von negativer Selektion. Ist dieser Prozess durchlaufen, verlässt die B-Zelle das Knochenmark und beginnt, unter anderem durch alternatives Splicing, zusätzlich B-Zell-Rezeptoren vom IgD-Typ auf der Oberfläche zu exprimieren. Man bezeichnet die nun im Blutkreislauf befindliche,  $IgD^+ IgM^+$  Zelle als reife, naive B-Zelle [135].

Die reife, naive B-Zelle wandert nun durch das Blut und die sekundären lymphatischen Organe. Kommt es hier nun über den BCR zum Kontakt mit dem für die Zelle spezifischen Antigen, folgt anschließend, nach Prozessieren des Antigens, die Präsentation dieses Antigens über major histocompatibility complex (MHC) Klasse II Moleküle auf der Oberfläche der B-Zelle. Wird nun dieses präsentierte Antigen ebenfalls von einer T-Helfer Zelle ( $T_{H2}$ -Zelle), welche für das Antigen spezifisch ist, erkannt, kommt es durch die Interaktion zwischen T- und B-Zelle letztendlich zur Aktivierung der B-Zelle [125].

Anschließend kommt es dann bei einem Teil der Zellen zur Ausdifferenzierung in kurzlebige Plasmazellen. Sie beginnen mit der Produktion niedrig affiner Antikörper gegen ihr Antigen. Ein anderer Teil begibt sich zu den primären Follikeln der sekundären lymphatischen Organe, wo sie zusammen mit anderen Zellen die germinal centers (GC), zu deutsch Keimzentren, bilden. Hier werden dunkle und helle Zone sowie die Mantelzone voneinander unterschieden. In der dunklen Zone kommt es unter schneller Teilung der Zellen zu den bereits beschriebenen somatischen Hypermutationen, die auch die Affinität der später produzierten Antikörper weiter steigern sollen [99]. Der Vorgang wird auch als Affinitätsreifung bezeichnet. Im Anschluss wird dann in der hellen Zone die Funktionalität dieser Reifung überprüft und bei ausbleibender Affinitätssteigerung über Apoptose aussortiert [98]. Die B-Zellen mit erfolgreich gesteigerter Affinität bleiben bestehen, was als positive Selektion bezeichnet wird.

Schließlich differenzieren sich diese Zellen dann, nachdem wiederum Klassenwechsel vollzogen worden sind, einerseits zu Antikörper produzierenden Plasmazellen und andererseits zu Gedächtniszellen, die in einen rezirkulierenden Kreislauf eintreten und bereit für den Zweitkontakt mit dem Antigen sind. [103,132,166,167]

## **2.2.3 Einteilung und Klassifikation der Lymphome**

### **2.2.3.1 Klassifikation**

Die zuvor beschriebenen B-Lymphozyten, aber selbstverständlich auch die T-Lymphozyten, können entarten. Es kommt zur Entstehung von Lymphomen.

Die B-Zell-Lymphome können wiederum weiter differenziert werden. In den letzten Jahren und Jahrzehnten gab es immer wieder verschiedene Klassifikationssysteme, die sich wesentlich voneinander unterscheiden. In der überarbeiteten Kiel Klassifikation von 1988 unterschied man zum einen B- und T-Zell Neoplasien und unterteilt die aggressiven, großzelligen Lymphome weiterhin in anaplastisch, immunoblastisch und zytoblastisch [158]. Die 1994 veröffentlichte R.E.A.L.-Klassifikation fasste erstmals die aggressiven, großzelligen Lymphom-Entitäten unter dem Begriff der diffus großzelligen B-Zell Lymphome (DLBCL) zusammen [69]. Unter anderem ist das besonders interessant, da die DLBCL's mit einer Inzidenz von 7,9 pro 100 000 Einwohner die häufigste maligne hämatologische Erkrankung darstellen (ermittelt zwischen 2004 und 2009 in den UK) [156].

Die aktuellste Klassifikation ist die 2016 überarbeitete Version der WHO-Klassifikation [160]. Hier wird zunächst zwischen den reifen B-Zell Neoplasien, den reifen T- und NK-Zell Neoplasien, den Hodgkin Lymphomen, den lymphoproliferativen Erkrankungen nach Transplantation (PTLD) sowie den Histozyten und dendritischen Zell Neoplasien unterschieden.

Die reifen B-Zell Neoplasien werden dann wiederum in sich vielfach differenziert. Eine dieser Untergruppen stellen die diffuse large cell B-cell lymphoma, not otherwise specified (DLBCL, NOS) dar.

Durch die Möglichkeit mit Hilfe von komplementären Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Microarrays die Genexpression vieler Gene parallel zu beobachten, kam es nun auch zu neuen Erkenntnissen in der Einteilung von Lymphomen [143].

### **2.2.3.2 Subklassifikationen**

Die primär wichtigste Subklassifikation des DLBCL, NOS ist die Unterscheidung nach der Ursprungszelle (cell of origin (COO)). Man unterscheidet hier den germinal center b-cell type (GCB) und den activated b-cell type (ABC). Dabei handelt es sich um zwei Subgruppen, die sich vor allem bezüglich ihres Genexpressionsmusters voneinander unterscheiden. Es handelt sich hierbei um unterschiedliches Vorkommen von genetischen Aberrationen unterschiedlichster Art in einer Vielzahl verschiedener Gene, in deren Folge es zur Expression verschiedenener onkogenener Signalkaskaden mit Relevanz für die Pathogenese der jeweiligen Lymphome kommt. Einige Translokationen oder Expressionsmuster finden sich fast ausschließlich in einer der beiden Subklassen. Andere treten wiederum in beiden Subklassen auf. Die verschiedenen Genexpressionsmuster ähneln den Mustern der komplementären physiologischen Lymphozyten. So gibt es beim GCB-Typ große Übereinstimmung mit

Lymphozyten im Keimzentrum. Das Genexpressionsmuster des ABC-Typs ähnelt dem der aktivierten B-Zelle im peripheren Blutkreislauf. [9,45,46]

Die zwei Subgruppen unterscheiden sich jedoch nicht nur in ihrem Genexpressionsmuster, sondern auch bezüglich ihres klinischen Outcomes. Patienten mit einem DLBCL vom GCB-Typ zeigen ein signifikant besseres Gesamtüberleben, als Patienten mit einem DLBCL vom ABC-Typ [9].

### **ABC-Typ**

Der ABC-Typ zeichnet sich durch einen aktivierten B-Zell-Rezeptor Signalweg und damit verbunden einen aktiven NF-kappaB Signalweg aus [9,45,46].

Es existieren einige, für den ABC-Typ typische, genetische Aberrationen.

Eine dieser Aberrationen, die gehäuft auftreten, betrifft CD79 A/B. Die beiden Proteine sind Teil des BCR und essentiell für dessen Bindung und weitere Signalgebung. Dementsprechend sind sie auch an der nachfolgenden Aktivierung des NF-kappaB Signalwegs beteiligt (siehe Lymphomentstehung) [46].

Eine weitere häufige genetische Aberration, die ebenfalls den NF-kappaB Signalweg beeinflusst, ist eine missense mutation im Gen des Stützproteins CARD11 [119].

Ein weiteres, beim ABC-Typ häufig dereguliertes Protein, welches wiederum in den NF-kappaB Signalweg eingreift, ist das Adapterprotein MYD88. Normalerweise kommt es durch den toll-like receptor zur Aktivierung dieses Proteins [120].

Es gibt eine Vielzahl weiterer genetischer Aberrationen, die zum Teil fast ausschließlich beim ABC-Typ, zum Teil jedoch auch beim GCB-Typ vorkommen können, auf die hier nicht weiter eingegangen wird.

### **GCB-Typ**

Typisch für den germinal center b-cell type sind einige BCL2 Translokationen, wie zum Beispiel die t(14;18)(q32;q21.3), bei dem das BCL2 Gen in die unmittelbare Nähe eines Immunglobulin Enhancers gebracht wird. Das führt letztendlich zu einer Überexpression von BCL2 (siehe 2.2.4.2). Diese Translokationen finden sich in bis zu 40% aller DLBCLs vom GCB-Typ. Sie finden sich jedoch auch äußerst selten beim ABC-Typ [78].

Im Gegensatz zum ABC-Typ findet sich beim GCB-Typ keine Aktivierung des NF-kappaB Signalwegs.

### **2.2.3.3 Klinische Klassifikation und prognostische Indices**

Weiterhin lassen sich die Lymphome anhand ihres Ausbreitungsmusters klinisch in Stadien einteilen. Allen voran ist hierbei die sogenannte Ann-Arbor Klassifikation zu nennen, die ursprünglich zwar für Hodgkin Lymphome geschaffen wurde, aber mittlerweile auch für Non-Hodgkin Lymphome (NHL) verwendet wird [97].

Aufgrund der mittlerweile üblichen diagnostischen Standards in den Staginguntersuchungen für Non-Hodgkin Lymphome, die insbesondere die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) beinhalten, kam es zur Schaffung der sogenannten Lugano-Klassifikation, die auf der Ann-Arbor-Klassifikation aufbaut [36].

Davon abzugrenzen sind sogenannte prognostische Indices, mit Hilfe derer sich eine Aussage über die Prognose fällen lässt. Allen voran ist der Internationale prognostische Index (IPI) zu erwähnen, bei dem die Patienten anhand der Ausprägung der Faktoren Alter, Allgemeinzustand (ECOG), Ann-Arbor Stadium, Befall extranodaler Organe, sowie der Laktatdehydrogenase (LDH) in vier verschiedenen Risikogruppen mit unterschiedlicher Prognose eingeteilt werden können. Wahlweise ist dies auch altersadjustiert (aaIPI) möglich [77]. Ein neuerer, weiter entwickelter prognostischer Index, der National Comprehensive Cancer Network (NCCN) IPI, ist zwar in der Lage, genauere Aussagen zu machen, wird aufgrund seiner zu hohen Komplexität im klinischen Alltag jedoch noch nicht flächendeckend als Standard durchgeführt [190].

## **2.2.4 Lymphomentstehung**

Wie zu Beginn schon beschrieben, ist die Tumorgenese ein sehr komplexes Thema. Konzentriert man sich nun auf die Lymphome im Speziellen, so lassen sich dort nochmals einige konkretere Sachverhalte erörtern. Dabei werden folgend verschiedene Mechanismen der Lymphomentstehung diskutiert.

### **2.2.4.1 Infektionen**

Der Zusammenhang zwischen Infektionen und NHL ist bereits häufig untersucht worden. Bekannte Beispiele sind das mucosa associated lymphoid tissue (MALT)-Lymphom, welches im Zusammenhang mit *Helicobacter pylori* steht [183]. Aber auch zum Beispiel die Infektion durch das Epstein-Barr-Virus (EBV) kann die Lymphomentstehung beeinflussen [92]. Des Weiteren gibt es einige Untersuchungen, die einen Zusammenhang zwischen zahlreichen Autoimmunerkrankungen und NHL belegen. Als Beispiel wären da die rheumatoide Arthritis [109], aber auch der systematische Lupus erythematoses [110], sowie die Zöliakie [63] zu nennen.

### **2.2.4.2 Genetische Aberrationen**

Ebenfalls ist bekannt, dass zahlreiche genetische Aberrationen in verschiedenen Genen, meist Protoonkogenen oder Tumorsuppressorgenen, zentraler Bestandteil der Lymphomgenese sind. Dabei gibt es verschiedene Muster, die teilweise den verschiedenen Subklassen zuzuordnen sind.

## **BCL2**

Bei BCL2 handelt es sich um ein antiapoptotisches Molekül, welches dementsprechend bei Überexpression zur Entartung von Zellen führen kann [113]. Es zeigt sich eine aberrante Expression des BCL2 bei DLBCL beider Subklassifikationen, sowohl dem ABC-Typ, als auch beim GCB-Typ. Translokationen, die zu dieser aberranten Expression führen, betreffen jedoch fast ausschließlich den GCB-Typ und nur in sehr seltenen Fällen auch den ABC-Typ [78]. Jedoch findet sich in ungefähr 60% der DLBCLs vom ABC-Typ auch ein hohes BCL2 Level [74].

## **BCL6**

Bei BCL6 handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der eine wichtige Rolle in der Entwicklung und der Aufrechterhaltung von Keimzentren besitzt. Physiologisch regelt BCL6 die Differenzierung von naiven T-Helferzellen zu folliculären T-Helferzellen [121]. BCL6 wird negativ durch das PRDM1-Gen reguliert, welches für den Transkriptionsfaktor Blimp-1 kodiert [80]. Unter dem Kollektiv der DLBCL Patienten weisen bis zu 35 % eine aberrante BCL6 Expression auf. Bei circa einem Drittel dieser Fälle ist eine Translokation des Gens ursächlich. Diese Translokationen treten wiederum bei DLBCLs des ABC-Typs häufiger auf (2:1). Meist sind Immunglobulin Schwereketten- oder Leichtkettenloci an dem rearrangement beteiligt [127].

## **MYC**

Bei MYC handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, dessen physiologische Aufgabe im Bereich der Apoptose liegt. MYC besitzt ein großes onkogenes Potenzial, welches bei aberranter Expression zum Vorschein kommt. In 5-14 % aller DLBCLs konnte ein rearrangement oder seltener auch eine Genamplifikation beobachtet werden, wesentlich häufiger jedoch beim GCB-Typ als beim ABC-Typ [85]. Häufig handelt es sich hier um Translokationen von Immunglobulin-Genloci [127].

Bei gleichzeitigem Auftreten von MYC- und BCL2- und/oder von BCL6-Translokationen spricht man von double-hit beziehungsweise triple-hit Lymphomen. Nach der 2016 veröffentlichten neuen Klassifikation der Lymphome spricht man in diesen Fällen von sogenannten High-grade B-cell Lymphoma (HGBL) mit Gen-Rearrangements, einer eigenen Subklasse [160].

Differenziert davon zu betrachten sind solche Lymphome, bei denen es zwar zur aberranten Expression von MYC, BCL2 und BCL6 kommt, jedoch keine rearrangements vorliegen. Bei vorliegender Überexpression von MYC und BCL2 spricht man vom sogenannten double-expressor Phänotyp (Nachweis von MYC in über 40% der Zellen, sowie Nachweis von BCL2 in über 50% der Zellen). Der ABC-Typ ist mit dem double-expressor Phänotyp und einer daraus resultierenden noch schlechteren Prognose besonders vergesellschaftet [127,160].

### **2.2.4.3 Chronische Antigenstimulation**

Schon lange ist bekannt, dass es einen Zusammenhang zwischen der Stimulation des B-Zell-Rezeptors durch Antigene und der Pathogenese von Lymphomen gibt [43].

Dabei tragen die Signalwege, die vom stimulierten BCR ausgehen, zum fortwährenden Überleben der Tumorzellen bei und sind essentieller Bestandteil der Tumorgenese [91].

Studien konnten des Weiteren bereits zeigen, dass bei der CLL bei einem Drittel aller  $V_H$ -Domänen des BCR, genau diese Domäne stereotype Sequenzen zeigt [4]. Auch beim Mantelzelllymphom konnte man solch eine Stereotypie der  $V_H$ -Domäne zeigen, wobei hier hervorzuheben ist, dass sich die Sequenzen der variablen Domänen der CLL und der Mantelzelllymphome signifikant voneinander unterscheiden [67]. Diese Tatsachen deuten auch bei diesen Erkrankungen auf einen Zusammenhang zwischen Antigenen, die die  $V_H$ -Domänen des BCR binden, und der Pathogenese der jeweiligen Erkrankung hin. Auch konnte gezeigt werden, dass es in DLBCLs vom ABC-Typ mit Mutationen in CD79A und CD79B (Bestandteil des immunoreceptor tyrosine-based activation motif des BCR) zu einem gesteigerten BCR-Signaling kommt [46]. Jedoch sind diese Mutationen nicht selbstständig in der Lage, ohne zusätzlichen Reiz, diesen Signalweg auch initial zu starten [46]. Das wiederum legte wiederum die Vermutung nahe, dass Autoantigene in diesem Prozess der Aktivierung eine Rolle spielen könnten. Young et al. konnten schließlich zeigen, dass die Fähigkeit des BCRs der DLBCLs vom ABC-Typ Autoantigene zu binden, eine große Bedeutung für das Überleben der Tumorzellen haben kann [188].

Im Einzelnen konnte bereits gezeigt werden, dass LRPAP1, ein in menschlichem Gewebe nahezu ubiquitär vorkommendes Antigen, häufig mit dem BCR von Mantelzelllymphomen reagiert [164]. Außerdem konnten SAMD14 und Neurabin-1 als die Autoantigen Ziele des BCR von primären ZNS Lymphomen identifiziert werden [163].

Weiterhin konnte ein Autoantigen identifiziert werden, welches in 60% der DLBCL ABC-Typ Fälle mit dem BCR reagiert. Es handelt sich hierbei um das arsenite resistance protein 2 (ARS2), ein für die Herstellung von microRNAs in Säugetieren wichtiges Protein. Das beschriebene Protein lag in den oben genannten Fällen des DLBCLs vom ABC-Typ immer hypophosphoryliert vor [165]. Das ARS2 ist das zentrale Autoantigen dieser Arbeit.

### **2.2.5 DLBCL Therapie**

Aufgrund der Aggressivität des DLBCLs ist man gezwungen therapeutisch zu intervenieren, da es sonst zu einem schnell fortschreitendem und letalem Krankheitsverlauf kommt. Man unterscheidet grundsätzlich die Erstlinientherapie von der Therapie nach Rezidiv oder refraktärer Erkrankung unter Therapie. Man spricht dann von der Zweit- oder gar Drittlinientherapie.

## 2.2.5.1 Erstlinientherapie

### Immunchemotherapie

Die Erstlinientherapie des DLBCLs besteht grundsätzlich aus einer Immunchemotherapie, die die Substanzen Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin (Doxorubicin), Oncovin (Vincristin), Prednisolon, sowie Rituximab miteinander kombiniert. Man spricht vom sogenannten R-CHOP Schema. Bereits vor der Zugabe von Rituximab wurde das klassische CHOP Schema, welches die oben genannten Substanzen, ausgenommen Rituximab, enthält, mit zahlreichen weiteren intensiven Chemotherapieregimen verglichen, wobei sich jedoch kein Vorteil zugunsten einer anderen Therapie zeigte [54].

Durch die Zugabe von Rituximab zum CHOP Schema kam es dann schließlich zu großen Fortschritten bezüglich des progressionsfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens [41,66,129,149].

Man unterscheidet in der Anwendung zwei verschiedenen Arten des R-CHOP Schemas.

Erstere Variante besteht aus acht Zyklen in 21-tägigen Intervallen. Die zweite Variante besteht aus sechs Zyklen in 14-tägigen Intervallen mit zusätzlicher zweimaliger Rituximab Gabe. Beide Schemata zeigten letztendlich vergleichbare Ergebnisse [42,130].

Es konnte sich zudem herauskristallisieren, dass bei Patientin mit einem niedrigen Risiko (entsprechend einem geringem IPI) im Alter von 18-60 Jahren vier Zyklen R-CHOP mit anschließenden zwei (insgesamt 6) Rituximab Gaben zu keinem verschlechterten Outcome führen [133].

Ein weiterer therapeutischer Ansatz, der bei jüngeren Patienten mit ungünstiger Prognose (entsprechend einem höheren IPI) Vorteile erbringen konnte, war der Zusatz von Etoposid zum Standard R-CHOP Schema. Man spricht hier vom R-CHOEP Schema [145].

Zusammenfassend können mit Hilfe der Immunchemotherapie als Erstlinientherapie des DLBCLs circa zwei Drittel der Patienten erfolgreich therapiert werden. Konkret konnten Studien zeigen, dass es bei jungen Patienten (18 bis 60 Jahre) innerhalb von 3 Jahren zu einem eventfreien Überleben von 79% kommt. Das Gesamtüberleben nach 3 Jahren betrug in dieser Studie 93% [129]. Bei älteren Patienten (60 bis 80 Jahre) kommt es laut Studien zu einem eventfreien Überleben nach 5 Jahren von 52%. Das Gesamtüberleben betrug in dieser Studie nach 5 Jahren 58% [52].

### Strahlentherapie

Zur Strahlentherapie des DLBCL in der Erstlinientherapie existieren weniger Daten als zur bereits geschilderten Immunchemotherapie. Jedoch konnte für die Strahlentherapie gezeigt werden, dass bei älteren Patienten die zusätzliche Bestrahlung von Bulks (Läsionen  $\geq 7,5$  cm) einen positiven Effekt auf das Outcome mit sich bringt [70].

## **2.2.5.2 Therapie bei Progress, Refraktärität und Rezidiv**

### **Autologe Stammzelltransplantation (Zweitlinientherapie)**

Die meist verwendete Zweitlinientherapie bei Rezidiv, refraktärer Erkrankung oder einem Progress für Patienten unterhalb des 70. Lebensjahres besteht aus einer sogenannten Salvage-Therapie (Chemotherapie) gefolgt von einer Hochdosischemotherapie mit anschließender autologer Stammzelltransplantation, bei der die zuvor mittels Stammzellapherese gesammelten eigenen Stammzellen zurückgegeben werden. Man konnte zeigen, dass bei chemosensiblen Rezidiven das ereignisfreie Überleben nach zusätzlicher autologer Stammzelltransplantation im Vergleich zur alleinigen Salvage-Chemotherapie signifikant besser ist.

Die PARMA Studie konnte für diese Therapie bei rezidierten DLBCL, nach bereits erfolgter Chemotherapie, ein eventfreies Überleben nach 5 Jahren von 46% und ein Gesamtüberleben nach 5 Jahren von 53% zeigen [131].

Die 2010 veröffentlichte CORAL Studie zur autologen Stammzelltransplantation bei rezidierten Erkrankungen nach bereits erfolgter Rituximab beinhaltender Immunchemotherapie konnte außerdem einen Zusammenhang zwischen dem Zeitpunkt des Auftretens des Rezidivs und der Ansprechrate der darauffolgenden Therapie herstellen. Bei einem Auftreten innerhalb der ersten 12 Monate nach Erstdiagnose der Erkrankung, zeigte sich eine Ansprechrate von nur 46%, verglichen mit einer Ansprechrate von 88% bei einem Auftreten mindestens 12 Monate nach der Erstdiagnose der Erkrankung [59]. Folglich ist die Prognose für frühe Rezidive des DLBCL deutlich eingeschränkt.

### **Polatuzumab (Zweitlinientherapie)**

Polatuzumab ist in der Kombinationstherapie mit Bendamustin und Rituximab für Patienten mit rezidierten oder refraktären DLBCL, die nicht für eine Hochdosischemotherapie mit anschließender Stammzelltransplantation in Frage kommen, zugelassen. Damit bietet sich diese Therapieoption auch insbesondere für ältere Patienten an, die für eine Hochdosischemotherapie meist nicht in Frage kommen. Bei Polatuzumab handelt es sich um ein Antibody-drug conjugate (ADC), also einen Antikörper, der an ein Toxin gekoppelt ist. Dieses Konstrukt ist gegen das Oberflächenprotein CD79b gerichtet. Es handelt sich bei Polatuzumab somit um eine targeted therapy (siehe 2.2.5.3).

CD79b ist ein Protein, das mit dem B-Zell-Antigenrezeptorkomplex assoziiert ist. Die antigenbindende Domäne des Polatuzumabs ist über einen Linker mit Monomethyl Auristatin E (MMAE), einem Spindelgift, verbunden. Studien konnten zeigen, dass es bei der umschriebenen Patientengruppe mit Polatuzumab in Kombination mit Bendamustin und Rituximab, verglichen mit der alleinigen Therapie mit Bendamustin und Rituximab, zu einer signifikant höheren Komplettremissionsrate und einer reduzierten Todeswahrscheinlichkeit von 58% kommt [150].

## **Allogene Stammzelltransplantation (Drittlinientherapie)**

Studien konnten für DLBCL nach dem ersten Rezidiv, bei refraktärer Erkrankung oder nach einem Progress keinen signifikanten Vorteil einer allogenen Stammzelltransplantation gegenüber einer autologen Stammzelltransplantation zeigen [6]. Bei der allogenen Stammzelltransplantation ist die Rate an Rezidiven zwar geringer, sie geht jedoch mit einem höheren Risiko für non-relapsed mortality (NRM), also therapiebedingter Mortalität, einher.

Zusammenfassend sind das auch die Gründe, weshalb die allogene Stammzelltransplantation aktuell nach der autologen Stammzelltransplantation lediglich die Drittlinientherapie des DLBCL ist [88,171]. Jedoch muss erwähnt werden, dass der Anteil der Patienten, die nach einer bereits erfolgten autologen Stammzelltransplantation noch einer weiteren allogenen Stammzelltransplantation ausgesetzt werden können, sehr gering ist. Das hängt maßgeblich mit dem Allgemeinzustand der Patienten nach erfolgter autologer Stammzelltransplantation zusammen. Im Zuge der GITMO Studie war der Anteil der Patienten, die sich einer allogenen Stammzelltransplantation nach bereits erfolgter autologer Stammzelltransplantation unterzogen, nur 19%, was zu Verzerrungen der Ergebnisse führen könnte [137].

## **Chimeric antigen receptor (CAR) T-Zellen (Drittlinientherapie)**

CD19 ist ein Oberflächenprotein, welches auf physiologischen B-Zellen, sowie auch auf malignen B-Zellen, jedoch nicht auf anderen Körperzellen, exprimiert wird [170]. Von einem chimären Antigen Rezeptor (CAR) spricht man, wenn der Rezeptor nicht der gleichen Herkunft entspricht wie die Zelle, auf der sich der Rezeptor befindet. Bei den CAR T-Zellen handelt es sich um autologe, vom Patienten selbst apherisierte T-Zellen, die gentechnisch mit einem chimären Antigenrezeptor versehen worden sind. Ziel ist es, dass der CAR sein Antigen spezifisch bindet (im Fall von B-Zell Lymphomen CD19) und dadurch die T-Zelle direkt zum Wirkort bringt, wo diese ihre zytotoxischen Effekte entfalten kann. Die Herstellung der anti-CD19 CAR T-Zellen erfolgt durch retroviralen oder lentiviralen Gentransfer. Die Zellen nutzen dann ein single-chain fragment variable (scFv), also ein single-chain Konstrukt (siehe 5.4.1.1), auf ihrer Oberfläche als Rezeptor zur Antigenbindung.

2015 konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass anti-CD19 CAR T-Zellen bei einem DLBCL zu einer Komplettremission führen können [89]. Auch bei der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) zeigt das Konzept der anti-CD19 CAR T-Zellen Erfolg [64]. 2018 wurden dann erstmalig in Deutschland mit dem Tisagenlecleucel und dem Axicabtagene-Ciloleucel zwei anti-CD19 CAR T-Zell Therapien zur Behandlung der ALL und des DLBCL (Tisagenlecleucel) beziehungsweise zur Behandlung des DLBCL und des primär mediastinalen B-Zell Lymphoms (PMBCL) (Axicabtagene-Ciloleucel) zugelassen. Voraussetzung sind jeweils zwei vorangegangene, erfolglose, konservative Therapieversuche [116,146]. Das besondere hierbei ist die Tatsache, dass es sich zu diesem Zeitpunkt um die erste Zulassung einer Gentherapie gegen maligne Erkrankungen in Deutschland handelte.

In einer Studie mit Axicabtagene-Ciloleucel bei refraktären und rezidivierten DLBCL, PMBCL und transformierten folliculären Lymphomen zeigte sich nach mindestens 6 Monaten in der Gruppe der DLBCL eine Ansprechrate auf die CAR T-Zellen von 82%. In der gesamten Studienpopulation ergab sich nach 6 Monaten ein Gesamtüberleben von 78% [116].

In einer Studie mit Tisagenlecleucel bei DLBCL mit Rezidiv nach autologer Stammzelltransplantation oder Unfähigkeit des Patienten sich einer autologen Stammzelltransplantation zu unterziehen, zeigte sich eine Ansprechrate von 52 %. In einer intention-to-treat Analyse, in der alle Patienten der Studie eingeschlossen wurden, zeigte sich ein Gesamtüberleben nach 12 Monaten von 40% [147].

In der Transcend NHL-001 Studie wurde eine dritte anti-CD19 CAR T-Zell Therapie bei refraktären und rezidivierten DLBCLs untersucht. Lisocabtagene-Maraleucel (liso-cel) zeigte eine Gesamtansprechrate von 73%, die Rate für komplettes Ansprechen lag bei 53%. Das mediane Gesamtüberleben der Studienpopulation betrug 19,9 Monate [1].

Alles in allem zeigt sich mit der CAR T-Zell Therapie ein hoffnungsvolles und innovatives Therapiekonzept für rezidierte und refraktäre DLBCLs. Warum sich die CAR T-Zell Therapie insbesondere für B-Zell Lymphome etabliert hat, hat mehrere Gründe. Zum einen ist der Anteil an positiven Zellen für das CAR Antigen (CD19) innerhalb der Gesamtheit der Tumorzellen sehr hoch. Des Weiteren ist die Zugänglichkeit zu den Tumorzellen für die CAR T-Zellen durch das Blut- und Lymphsystem sehr dankbar. Auch ist die hohe Spezifität in dem Sinne, dass sich der Oberflächenmarker CD19 zum Großteil nur auf B-Zellen befindet, sicherlich auch ein Grund für die herausragenden Ergebnisse bei B-Zell Lymphomen. Von Vorteil ist wohl auch, dass die Depletion aller gesunden B-Zellen verhältnismäßig gut von den Patienten toleriert wird [33].

Des Weiteren gibt es einige Forschungsprojekte zur stetigen Weiterentwicklung der bisher so erfolgsversprechenden CAR T-Zell Therapien. Zum Beispiel spricht man von der 4. Generation der CARs, wenn es um die sogenannten TRUCKs (T cell redirected for universal cytokine killing) geht. Diese versuchen ein Problem der CAR T-Zell Therapie bei soliden Tumoren zu lösen. Bei soliden Tumoren kommt es häufig zu einem, den Tumor umgebenden, anti-inflammatorischen Mikromilieu. Dieses hindert die CAR T-Zellen, sowie auch andere T-Zellen daran, die Tumorzellen erfolgreich zu zerstören. Durch die zusätzliche Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen wie zum Beispiel IL-12 durch die TRUCKs, soll dieses Problem beseitigt und die erfolgreiche Therapie weiter optimiert werden [33,39].

### **2.2.5.3 Weitere therapeutische Optionen**

Ein weiteres wichtiges und innovatives Therapiekonzept in der Bekämpfung von malignen Erkrankungen ist die sogenannte targeted therapy. Hierbei handelt es sich, im Gegensatz zu der

konventionellen Chemotherapie oder auch der Stammzelltransplantation, um eine Therapie, bei der die therapeutische Substanz spezifisch gegen ein Ziel gerichtet ist. Bei diesem target handelt es sich in der Regel um ein Protein, das für die Genese und das Überleben des Tumors von zentraler Bedeutung ist. Häufig handelt es sich hierbei um regulatorische Proteine des Zellzyklus. Aber auch andere Zielproteine sind denkbar [179]. Bei dem als Zweitlinientherapie verwendeten Polatuzumab handelt es sich ebenfalls um solch eine targeted therapy.

### **Venetoclax bei DLBCL ABC- und GCB-Typ**

Bei Venetoclax handelt es sich um einen hochselektiven BCL2 Inhibitor. Initial gewann Venetoclax vor allem in der Therapie der CLL von Bedeutung. Vor allem die Kombinationstherapie von konventioneller Chemotherapie mit Venetoclax hat sich bei refraktären CLL Erkrankungen als erfolgversprechend gezeigt und führte in Deutschland auch zu einer Zulassung [53,151,159].

Aufgrund der bereits beschriebenen Häufigkeiten von BCL2 Mutationen bei DLBCLs, sowohl beim GCB-Typ als auch beim ABC-Typ, entstand die Idee, die Wirksamkeit von Venetoclax auch bei Lymphomen zu untersuchen [74,78]. In ersten Studien mit NHL zeigte sich in der Monotherapie mit Venetoclax eine Ansprechrates bei DLBCL von lediglich 18%, währenddessen die Ansprechrates beim Mantelzelllymphom bei 75% lag [44]. In weiteren Untersuchungen wurde die Wirksamkeit von Venetoclax in der Kombinationstherapie mit Bendamustin und Rituximab bei refraktären NHL untersucht. Hier zeigte sich beim DLBCL eine Ansprechrates von 41%. Diese lag jedoch erneut deutlich unter den Ansprechrates der Kombinationstherapie bei den folliculären Lymphomen (75%), sowie bei den Mantelzelllymphomen (100%) [47].

### **Lenalidomid bei DLBCL ABC- und GCB-Typ**

Bei Lenalidomid handelt es sich um eine immunmodulatorische Substanz (Immunomodulatory Drug; kurz IMiD). Die erste Substanz dieser Art war das Thalidomid, welches jedoch durch sein teratogenes Potenzial schnell in Verruf geriet [172]. Mittlerweile existiert eine Vielzahl weiterer, mit dem Thalidomid verwandten, IMiDs, wie das Lenalidomid. Diese zeichnen sich durch einen vielfältigen und komplexen Wirkmechanismus aus. Das Wirkspektrum dieser Substanzen beinhaltet beispielsweise die Inhibition der Tumornekrosefaktor (TNF)-alpha Synthese in aktivierten Monozyten. Weitere Wirkungen sind die Inhibition der Angiogenese und eine Co-Stimulation von aktivierten T-Zellen. Außerdem zeigten sich zahlreiche direkte antitumoröse Wirkungen, wie zum Beispiel die Initiation der Apoptose [16]. All diese Eigenschaften machen die IMiDs für die Therapie von Malignomen sehr interessant. Im direkten Vergleich mit der Vorläufersubstanz Thalidomid lässt sich sagen, dass das Lenalidomid wohl das potentere Medikament mit den geringeren unerwünschten Wirkungen ist [107]. Lenalidomid wird bereits erfolgreich in der Therapie des rezidivierten, beziehungsweise refraktären Multiplem Myeloms in einer Kombinationstherapie mit Dexamethason verwendet [48]. Aber auch in der Erstlinientherapie des Multiplem Myeloms wird das Lenalidomid erfolgreich verwendet [136]. In

Studien wurde die Ansprechrate einer Lenalidomid Monotherapie bei refraktären, beziehungsweise rezidivierenden, NHL untersucht. Für das DLBCL konnten mit 19% [178] und 28% [181] eher moderate Ansprechraten gezeigt werden. Eine weitere Studie kam zu dem Ergebnis, dass es für die Erhaltungstherapie mit Lenalidomid nach erfolgter partieller oder kompletter Remission nach R-CHOP Behandlung, bei älteren Patienten mit DLBCL ein signifikant längeres progressionsfreies Überleben gibt [161].

Eine andere Studie untersuchte Lenalidomid als Erhaltungstherapie für Patienten, die bereits eine wirksame R-CHOP Therapie erhielten, sich jedoch keiner autologen Stammzelltransplantation mehr unterziehen konnten. In der multizentrischen Phase II Untersuchung wurden 48 Patienten mit Lenalidomid behandelt. Die Studie ergab ein progressionsfreies Überleben nach einem Jahr von 70 % [51].

Die L-MIND Studie aus dem Jahr 2020 untersuchte die Kombinationstherapie von Tafasitamab, ein gegen CD19 gerichteter monoklonaler Antikörper, und Lenalidomid bei Patienten mit einem DLBCL Rezidiv, die bereits eine bis drei Immunchemotherapien erhalten haben. Die Studie konnte zeigen, dass 48% der Patienten die beide Substanzen erhalten hatten, auf die Therapie komplett oder partiell angesprochen haben [142].

Zusammenfassend lässt sich zu Lenalidomid sagen, dass es zurzeit in der Erhaltungstherapie von älteren und schwächeren Patienten wohl ein gutes Konzept ist. In der Initialtherapie des DLBCL erzielte es bislang jedoch nicht die gewünschten Ergebnisse.

### **Ibrutinib bei DLBCL ABC-Typ**

Die Bruton-Tyrosinkinase stellt einen zentralen Schnittpunkt zwischen dem BCR-Signalweg und dem NF-kappaB Signalweg dar. Bei Ibrutinib handelt es sich um einen Inhibitor dieser Bruton-Tyrosinkinase. Ibrutinib wird zur Behandlung der CLL, von Mantelzelllymphomen, sowie des Morbus Waldenström eingesetzt [29,169,177]. Studien zu einer Ibrutinib-Monotherapie bei refraktären und rezidierten DLBCL kamen zu dem Ergebnis, dass die Ansprechrate abhängig von der Subklasse des DLBCL ist. Beim ABC-Typ zeigte sich eine Ansprechrate von 37%, beim GCB-Typ zeigte sich jedoch nur eine Ansprechrate von 5 % [180]. Dieses Ergebnis deckt sich mit der pathophysiologischen Grundlage der zwei Subklassen. Dem ABC-Typ liegt, im Gegensatz zum GCB-Typ, ein dauerhaft aktivierter BCR-Signalweg und dementsprechend auch ein dauerhaft aktiver NF-kappaB Signalweg zugrunde [9,45,46]. Hier entfaltet Ibrutinib folglich seine Wirkung.

In einer Phase III Studie wurde die Wirksamkeit von Ibrutinib in einer Kombinationstherapie mit R-CHOP bei DLBCL vom ABC-Typ überprüft. Die Studie kam zu dem Ergebnis, dass es in der Gesamtpopulation keinen Vorteil der zusätzlichen Ibrutinib Gabe bezüglich des ereignisfreien Überlebens gibt. Es konnte jedoch auch festgestellt werden, dass in der Gruppe der unter 60-Jährigen ein Vorteil bezüglich des ereignisfreien Überlebens, des progressionsfreien Überlebens und des

Gesamtüberlebens für die zusätzliche Gabe von Ibrutinib existiert. Dieser Vorteil wird sich jedoch durch die Zunahme an schwerwiegenden unerwünschten Ereignissen erkaufte [187].

Verantwortlich für die teils widersprüchlich erscheinenden Untersuchungen zu Ibrutinib scheinen unter anderem Escape-Mechanismen zu sein. Unter Ibrutinib Therapie kommt es zu Mutationen downstream der Bruton-Tyrosinkinase, die die Wirkung des Ibrutinibs damit außer Kraft setzen können [84]. Um Ibrutinib in der Therapie des DLBCL zu etablieren ist es erst notwendig, diese Escape-Mechanismen aufzufindig zu machen und bestenfalls beheben zu können.

### **Bortezomib bei DLBCL ABC-Typ**

Bei Bortezomib handelt es sich um einen Proteasomeninhibitor. Durch Proteasomeninhibition in Krebszellen kommt es zu einer Akkumulation von pro-apoptotischen Regulatorproteinen, die dann schließlich zum Zelltod führen. Bortezomib führte in der Therapie des Multiplem Myeloms bereits zu Erfolgen [184].

Die Untersuchungen bezüglich des Erfolgs in der Therapie des DLBCL sind jedoch widersprüchlich. In einer 2009 veröffentlichten Untersuchung wurde der Effekt von Bortezomib in Kombination mit konventioneller Chemotherapie bei DLBCL untersucht. Die Studie kam zu dem Ergebnis, dass es beim ABC-Typ zu einer signifikant höheren Ansprechrate (83% vs 13%) und zu einem signifikant längeren medianen Gesamtüberleben (10,8 vs 3,4 Monate), verglichen mit dem GCB-Typ, kommt. Die pathophysiologische Hypothese ist, dass die Hemmung des NF-kappaB Signalwegs durch das Bortezomib, die normalerweise durch den überregulierten NF-kappaB Signalweg herabgesetzte Chemosensitivität des DLBCL ABC-Typs, steigert. Diese pathophysiologische Grundlage existiert beim DLBCL GCB-Typ nicht [50].

Eine 2017 veröffentlichte Studie, die ebenfalls den Zusatz von Bortezomib zu konventioneller R-CHOP Chemotherapie bei nicht vorbehandelten Non-GCB DLBCL untersuchte, kam jedoch zu dem Ergebnis, dass es für die zusätzliche Gabe von Bortezomib keinen Vorteil gegenüber der alleinigen Therapie mit R-CHOP gibt [96].

### **Checkpoint Inhibitoren**

Immun-Checkpoints spielen eine wichtige Rolle bei der Erkennung und Zerstörung von Tumoren durch das Immunsystem. Einige maligne Erkrankungen besitzen die Fähigkeit, sich durch die Aktivierung negativ regulatorischer Signalwege der Erkennung und Zerstörung durch das Immunsystem zu entziehen. Diese Methoden konnten sich als wichtiger Mechanismus für das Fortbestehen und Metastasieren von Tumorerkrankungen herauskristallisieren. Es existiert eine Vielzahl verschiedener solcher Mechanismen, zum Beispiel die Aktivierung von negativ costimulatorischen Proteinen wie dem programmed cell death protein 1 (PD-1) und dem cytotoxic lymphocyte associated protein 4 (CTLA-4) [23,93].

PD-1 befindet sich als Rezeptor auf den T-Zellen. Durch die Bindung des PD-1 Liganden, den einige Tumorzellen exprimieren, kommt es zur Aktivierung dieses Signalwegs, der letztendlich in einem inhibitorischen Signal für die T-Zelle endet. Es existieren zahlreiche monoklonale Antikörper, die durch die Inhibition dieses Signalwegs ihre Wirkung entfalten und damit zu einer Aktivierung des Immunsystems mit antitumoröser Wirkung beitragen. Zu nennen sind hier Nivolumab und Pembrolizumab, die als anti-PD-1 Antikörper agieren. Ebenfalls zu nennen ist das Atezolizumab, ein anti PD-L1 (PD-1 Ligand) Antikörper [124].

CTLA-4, welches sich ebenfalls auf der T-Zelle befindet, ist Teil einer komplexen Signalkaskade um mehrere Co-Rezeptoren. Durch die Inhibition von CTLA-4 kommt es letztendlich zu einer Entthemmung der Immunantwort und somit zu einer, gegen den Tumor gerichteten, Immunantwort. Ipilimumab ist dabei wohl einer der bekanntesten monoklonalen Antikörper, die als CTLA-4 Inhibitoren agieren [124]. Die Immun-Checkpoint Inhibition erlangte in den letzten Jahren zunehmend das Interesse, insbesondere in der Therapie von soliden Tumoren, wie dem malignen Melanom oder dem nicht kleinzelligen Lungenkarzinom [58,168].

Eine frühe Studie an refraktären und rezidierten NHL mit dem anti-CTLA-4 Antikörper Ipilimumab zeigte bei einem, der in der Studie eingeschlossenen DLBCL, ein komplettes Ansprechen auf die Therapie. Die Gesamtansprechrates in der Gesamtpopulation der Studie betrug jedoch lediglich 11 % [12].

2013 wurde die erste klinische Studie veröffentlicht, in der eine Wirkung einer PD-1 Inhibition bei DLBCL gezeigt werden konnte. Die Studie kam zu dem Ergebnis, dass bei DLBCL Patienten, die bereits eine autologe Stammzelltransplantation erhielten, die dreimalige Gabe von Pidilizumab, einem anti-PD-1 Antikörper, zu einer Ansprechrates von 51 % führte [15].

Eine neuere Studie von 2019 zur Wirkung von Nivolumab (PD-1 Inhibitor) bei refraktären und rezidierten DLBCL, die sich keiner autologen Stammzelltransplantation unterziehen konnten oder bereits eine fehlgeschlagene autologe Stammzelltransplantation hinter sich hatten, konnte jedoch weniger hoffnungstragende Ergebnisse hervorbringen. In der transplantationsunfähigen Gruppe zeigte sich nach 6 Monaten eine Ansprechrates von nur 3 %. Die Ansprechrates in der transplantationsgescheiterten Gruppe lag nach 9 Monaten ebenfalls nur bei 10 % [13].

Im Zuge der Niveau Studie (DSHNHL 2015-1) wird aktuell die Checkpoint-Inhibition in einer multizentrischen Phase 3 Studie bei älteren Patienten im ersten Rezidiv oder nach Progress eines aggressiven, CD20 positiven B-Zell NHL, die sich keiner Hochdosismotherapie unterziehen können, untersucht. Im Detail wird die Wirksamkeit der Kombinationstherapie von Nivolumab (PD-1 Inhibitor) mit Gemcitabin, Oxaliplatin und Rituximab mit der alleinigen Therapie von Gemcitabin, Oxaliplatin und Rituximab verglichen [71].

Die bisher eher weniger zufriedenstellenden Ergebnisse der Checkpoint-Inhibition bei DLBCLs könnten vermutlich mit der vergleichsweise niedrigen Expression des PD-1 Liganden auf den Tumorzellen zusammenhängen. Beim nodulär sklerosierenden Typ des klassischen Hodgkin Lymphoms (die häufigste Subklasse des Hodgkin Lymphoms), sowie beim primär mediastinalen großzelligen B-Zell Lymphom (PMLBL) konnte ein Zusammenhang zwischen der Amplifikation eines Gens und der bei diesen Tumoren erhöhten Expression des PD-1 Liganden gezeigt werden [62]. Für diese Lymphomentitäten sind daher die Ergebnisse bezüglich der PD-1 Inhibition auch wesentlich erfolgsversprechender [186,191].

Beim DLBCL konnten bislang jedoch keine solche Genamplifikationen nachgewiesen werden. Die Expression des PD-1 Liganden ist auf Zellen von DLBCL verhältnismäßig gering [10].

Eine andere Idee, die einige Forscher verfolgen, ist die Kombination der Checkpoint-Inhibition mit anderen Lymphomtherapien. So gibt es bereits erste Arbeiten zu der Kombination von anti-PD-L1 Antikörpern mit dem Bruton-Tyrosinkinase Inhibitor Ibrutinib [140].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in der Therapie des DLBCL mit Checkpoint-Inhibitoren prinzipiell großes Potenzial steckt. Bislang ist jedoch noch eine unzureichende wissenschaftliche Grundlage vorhanden, um dieses Potenzial vollends auszuschöpfen. Die Forschung steht hier noch am Anfang.

## **2.3 Zielsetzung der Arbeit**

Die Kombination der Tatsachen, dass zum einen die bisherige konservative Therapie der DLBCLs, insbesondere vom ABC-Typ, das Überleben nicht in dem Maß sichert wie gewünscht und auf der anderen Seite die Pathogenese dieser Lymphome mehr und mehr verstanden wird, lässt neue Ideen und Möglichkeiten bezüglich der Therapie zu.

Eine dieser Ideen ist die der sogenannten B-cell receptor antigens for reverse targeting (BAR) [164]. Hierbei macht man sich den Mechanismus der Autoantigen Stimulation in der Pathogenese zu Nutze. Wie bereits erläutert binden gewisse Anteile verschiedener Lymphomentitäten mit ihrem BCR spezifisch diese jeweiligen Autoantigene. Im Umkehrschluss heißt das wiederum, dass dieses Antigen den BCR und damit das Lymphom spezifisch binden kann. Man spricht auch von einer targeted therapy, die im Unterschied zur konventionellen Chemo- oder Radiotherapie spezifischer am Tumor selbst wirkt [102].

Das Ziel dieser Arbeit war nun, sich dieses BAR-Konzept zu Nutze zu machen. Dazu wurde ein spezifisches Autoantigen an einen Antikörper oder an ein antikörperähnliches Konstrukt gekoppelt. Dadurch soll weiterführend ein spezifisches Töten von Tumorzellen ermöglicht werden. In dieser Arbeit

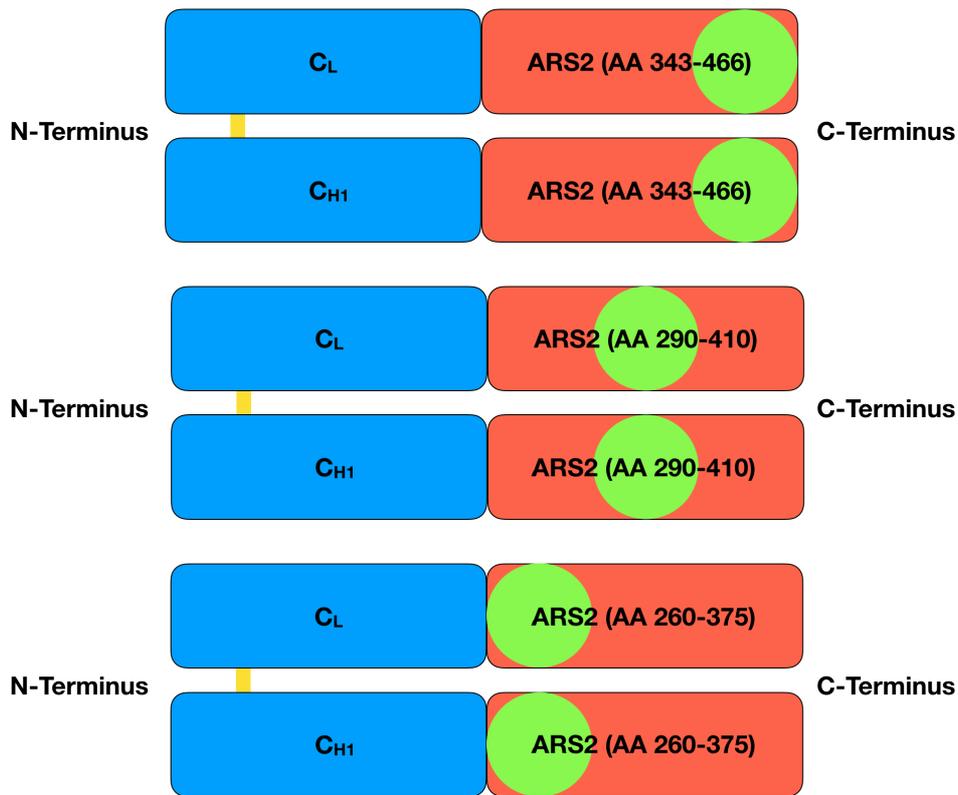
sollen unterschiedliche Arten von Antikörper-Konstrukten auf ihre mögliche Bindung und Zytotoxizität bezüglich des DLBCL vom ABC-Typ getestet werden.

### **2.3.1 Antigen und Zelllinie**

Das Autoantigen, mit dem gearbeitet wurde, ist das oben beschriebene ARS2. Es bindet spezifisch den BCR der U2932 Zelllinie, eine DLBCL Zelllinie vom ABC-Typ. Die Gensequenz, mit der das ARS2 mit dem BCR interagiert, also das Epitop, besteht aus den Aminosäuren 343 bis 375 des ARS2 Proteins [20].

### **2.3.2 Fab Konstrukte**

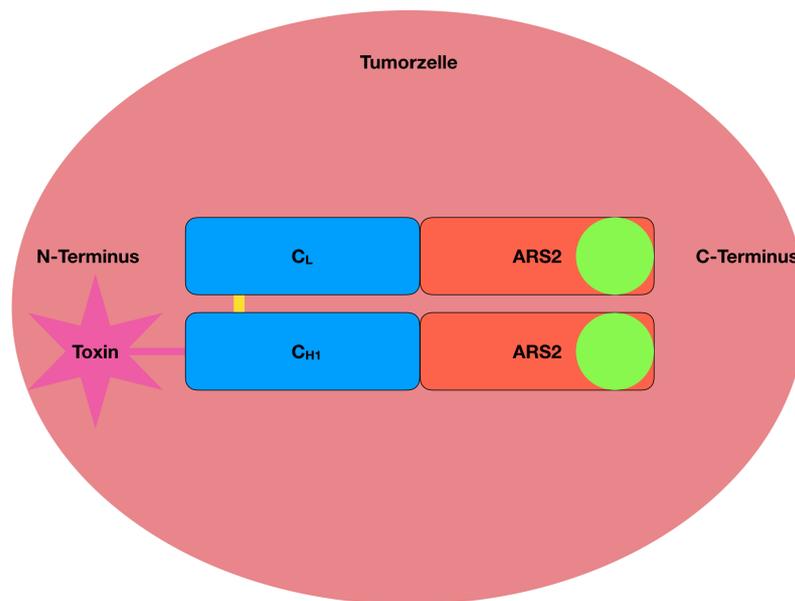
Zunächst wurde ein dem Fab-Fragment eines Antikörpers ähnliches Konstrukt, das sogenannte BAR Fab-Konstrukt hergestellt. Anstelle der eigentlichen variablen Domänen des Fragments rückten, sowohl in der leichten als auch in der schweren Kette, eine jeweils identische ARS2 Sequenz. Es sollten drei verschiedene solcher Konstrukte hergestellt werden, die auch drei verschiedenen Ausschnitte der ARS2 Sequenz beinhalten. Immer enthalten in dieser Sequenz ist das Epitop (AA343-375), welches den BCR binden soll. Durch die unterschiedliche Stellung des Epitops innerhalb der variablen Domäne sollte zunächst herausgefunden werden, welche dieser Positionen für die Bindung des Konstrukts an der Zielzelle am erfolgreichsten ist. Um den ursprünglichen Fab-Fragmenten, bei denen die variable Domäne aus ungefähr 100 Aminosäuren besteht, möglichst ähnlich zu sein, entschied man sich dazu, bei den unterschiedlichen verwendeten ARS2 Sequenzen eine ähnliche Länge (zwischen 115 und 123 AA) zu verwenden. Die daraus resultierenden Sequenzausschnitte waren AA 343-466, AA 290-410 und AA 260-375.



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der Fab Konstrukte**

Die Abbildung zeigt schematisch drei verschiedene Fab Konstrukte untereinander. Die Fab Konstrukte bestehen jeweils aus der konstanten Domäne der leichten Kette (C<sub>L</sub>) und der konstanten Domäne 1 der schweren Kette (C<sub>H1</sub>). Beide sind über eine Disulfidbrücke (gelb) miteinander verbunden. Links ist der N-Terminus markiert. Am C-Terminus der konstanten Domänen schließt sich dann jeweils an jede Kette eine ARS2 Sequenz an. Die grüne Markierung zeigt schematisch die Position des Epitops (AA 343-375) in Bezug zur gesamten, im Konstrukt enthaltenen, ARS2 Sequenz. Rechts ist der C-Terminus markiert.

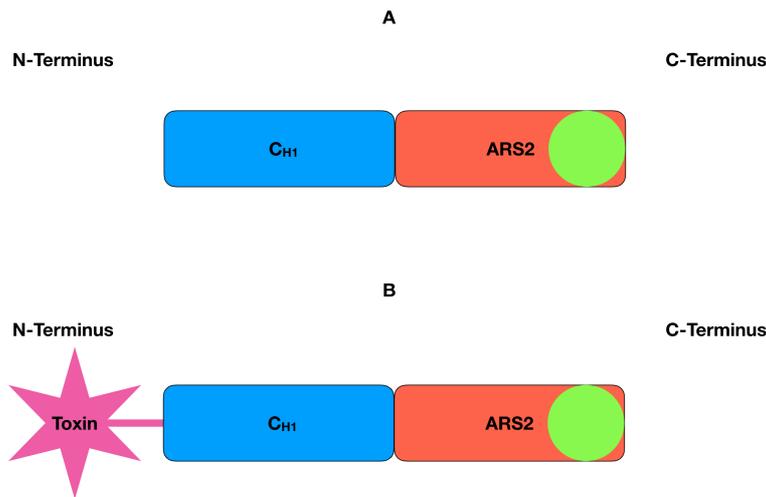
Sollte eines dieser Konstrukte nun erfolgreich auf der U2932 Zelllinie binden, könnte eben diese Sequenz auch für die anderen, später synthetisierten und getesteten Konstrukte dienen, wodurch dem Fab-Konstrukt eine ganz grundlegende Rolle zukommt. Das sich daran unmittelbar anschließende Ziel war nun die Kopplung an ein Toxin. In dieser Arbeit wurde das Exotoxin A (ETA), beziehungsweise das ETA-KDEL verwendet [128,148]. Dadurch soll es, nachdem das Toxin mitsamt Konstrukt von der Zelle internalisiert worden ist, zur Lyse der Tumorzellen kommen.



**Abbildung 5: Schematische Darstellung des Fab-ETA (bzw. ETA-KDEL) Konstrukts an seinem Wirkort**  
 Zu erkennen ist zum einen die hautfarbene Tumorzelle im Hintergrund. Zentral ist das ARS2 Fab-ETA Konstrukt mit der konstanten Domäne der leichten Kette (C<sub>L</sub>), der konstanten Domäne 1 der schweren Kette (C<sub>H1</sub>) und jeweils einer ARS2 Sequenz zu erkennen. Mit grün ist die Lage des Epitops beispielhaft markiert, da hier keine exakte Angabe über die genaue ARS2 Sequenz gemacht werden kann. Mit der Schwerkette verbunden ist das Toxin, welches entweder dem ETA oder dem ETA-KDEL Toxin entspricht. Des Weiteren zu erkennen ist die Disulfidbrücke zwischen den konstanten Domänen (gelb).

### 2.3.3 Schwerketten-Konstrukte

Bei den Schwerketten-Konstrukten handelt es sich um Konstrukte, die von den Fab-Konstrukten abgewandelt wurden. Sie bestehen lediglich aus deren schweren Kette, also aus der konstanten Domäne 1 und einer ARS2 Sequenz, sowie fakultativ ergänzend einem Toxin. Als Toxin wurde wiederum das ETA, sowie das ETA-KDEL verwendet. Hintergrund der Konstrukte ist, dass durch eine geringere Größe und eine monovalente, statt wie bei den Fab-Konstrukten eine bivalente Bindung, eine Internalisierung womöglich erleichtert werden kann.



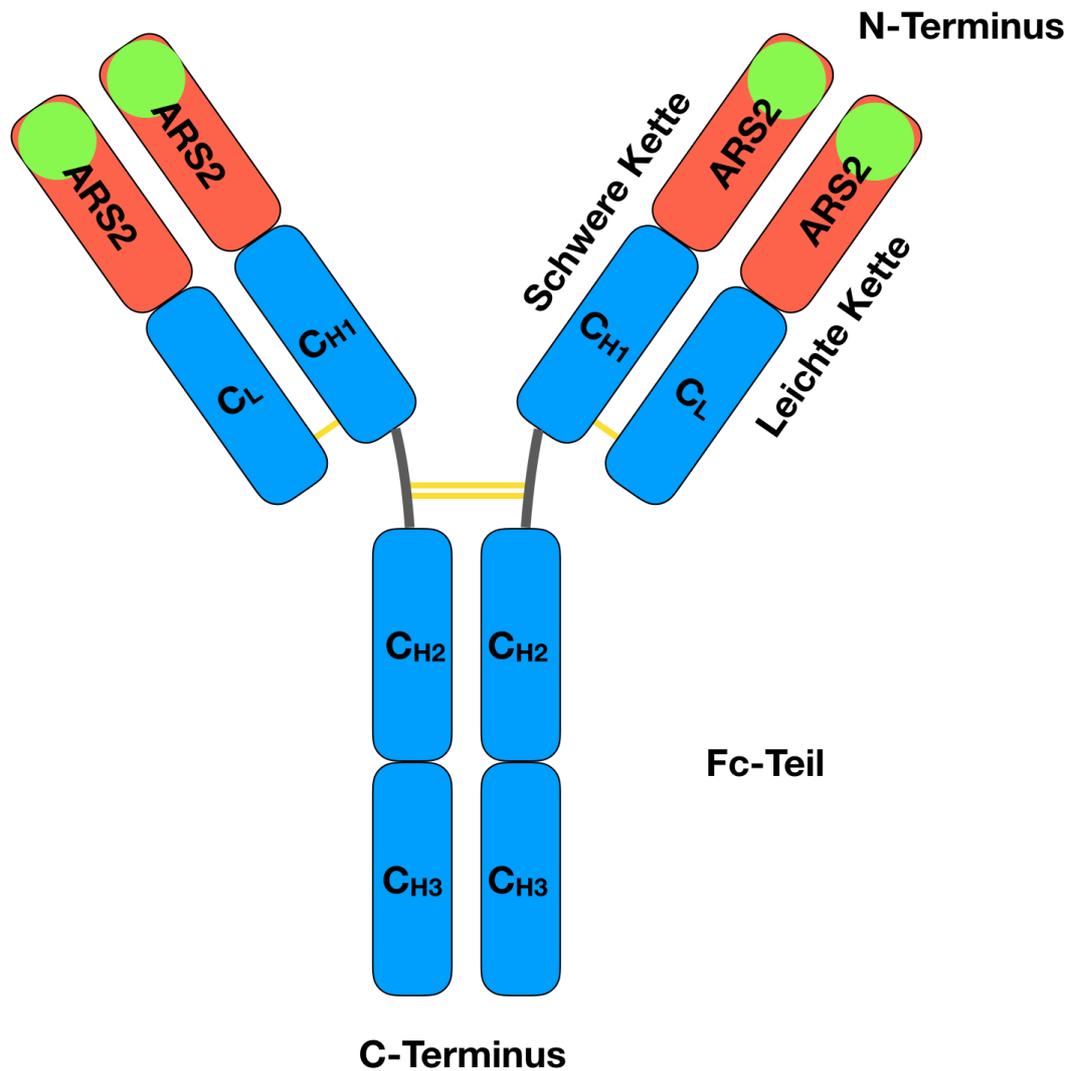
**Abbildung 6: Schematische Darstellung der Schwerketten-Konstrukte**

**A: Schwerketten-Konstrukt** Zu sehen ist das Schwerketten Konstrukt mit konstanter Domäne 1 ( $C_{H1}$ ) und ARS2 Sequenz. Die grüne Markierung zeigt beispielhaft die Lage des Epitops, da die genaue ARS2 Sequenz hier noch nicht bekannt ist. Links ist der N-Terminus und rechts der C-Terminus des Konstrukts markiert.

**B: Schwerketten-Toxin-Konstrukt** Zu sehen ist das Schwerketten Konstrukt mit gekoppeltem Toxin. Es sind konstante Domäne 1 der Schwerkette ( $C_{H1}$ ), sowie eine ARS2 Sequenz zu sehen. Die grüne Markierung zeigt beispielhaft die Lage des Epitops, da die genaue ARS2 Sequenz hier noch nicht bekannt ist. Links ist der N-Terminus und rechts der C-Terminus des Konstrukts markiert. Weiterhin ist das an die Schwerkette gekoppelte Toxin zu erkennen (lila).

## 2.3.4 Antikörper Konstrukte

Bei vorheriger erfolgreicher Durchführung des BAR Konzepts mit den Fab Konstrukten und den Schwerketten Konstrukten, sollte in dieser Arbeit noch ein weiteres Konzept, das des BAR Antikörpers in Volllänge getestet werden. Auf der Basis des Fab Konstruktes und in Anlehnung an das Rituximab, welches in der Vergangenheit bereits bahnbrechende Erfolge in der Lymphomtherapie verzeichnen konnte, wird hier keine Kopplung an ein Toxin benötigt [105]. Die Lyse der Tumorzellen und damit die Zytotoxizität des Konstrukts soll hier über das eigene Immunsystem des Patienten, genauer über die ADCC, aber auch über die CDC, vermittelt werden [139].



**Abbildung 7: Schematische Darstellung des BAR-Antikörpers**

Die Abbildung zeigt schematisch den BAR-Antikörper. Zu erkennen ist am unteren Ende der Fc-Teil mit dem C-Terminus und den konstanten Domänen zwei und drei der zwei schweren Ketten (CH2 und CH3). Direkt darüber ist die hinge-region mit den dazugehörigen zwei Disulfid-Brücken (gelb) zu erkennen. Am oberen Ende findet sich links und rechts jeweils ein Fab-Fragment, bestehend aus der leichten Kette mit konstanter Domäne (CL) und der ARS2 Sequenz, sowie dem oberen Teil der schweren Kette, bestehend aus der ersten konstanten Domäne (CH1) und der ARS2 Sequenz. In der ARS2 Sequenz ist beispielhaft das Epitop grün markiert. Die genaue Lage ist noch unbekannt. Innerhalb des Fab-Fragments werden schwere und leichte Kette ebenfalls durch eine Disulfidbrücke (gelb) miteinander verbunden. Der N-Terminus definiert das obere Ende des Fab-Fragments.

## 3. Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Laborgeräte

Gerät	Firma
Agarose-Gel Kammer	Bio-Rad (München, D)
BD FACS Canto™ Flow Cytometer	BD Biosciences (Heidelberg, D)
HERAsafe HSP18 Sicherheitswerkbank (Hood)	Heraeus (Hanau, D)
HERAcell 240 CO <sub>2</sub> Inkubator	Heraeus (Hanau, D)
Nano-Drop Spectrophotometer	Peqlab Biotechnologie (Erlangen, D)
Neubauer-Zählkammer	Eppendorf (Hamburg, D)
Photometer Gene Quant pro	Amersham plc (Little Chalfont, UK)
Trans-Blot SD, semi-dry transfer cell	Bio-Rad (München, D)
Wallac Victor <sup>2</sup> , 1420 Multilabel Counter	Perkin Elmer (Rodgau, D)
Western-Blot-Gelkammer	Bio-Rad (München, D)
Veriti, 96 Well Thermal Cycler	Applied Biosystems (California, D)

**Tabelle 1: Laborgeräte**

Die Tabelle zeigt links den Namen des Geräts und rechts die entsprechende Firma.

#### 3.1.2 Verbrauchsmaterialien

##### 3.1.2.1 Chemikalien und Sonstiges

Sofern nicht weiter angegeben, wurden die Chemikalien von Merck (Darmstadt, D) bezogen.

Name	Firma
Acrylamid Mix 30%	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, D)
Adefo Mix Sa Entwickler	Adefo-Chemie GmbH (Neu-Isenburg, D)

Adefo Mis Sa Fixierer	Adefo-Chemie GmbH (Neu-Isenburg, D)
Agarose	siehe oben
Amersham Hyperfilm ECL, high performance chemiluminescence film	GE Healthcare (Little Chalfont, UK)
Amicon Stirred Ultrafiltration Cell Model 202	Merck (Darmstadt, D) (früher Millipore (Massachusetts, USA))
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck (Darmstadt, D)
Ampicillin (100 µg/ml)	siehe oben
Anti-FLAG-Matrix	siehe 3.2.9.3
BD Bacto™ Tryptone	BD Biosciences (Heidelberg, D)
BD Bacto™ Yeast Extrakt	BD Biosciences (Heidelberg, D)
BD Pharmingen™ APC Streptavidin (0,2 mg/ml)	BD Biosciences (Heidelberg, D)
Biocoll, Dichte 1,077 g/ml, isotonisch	Biochrom GmbH (Berlin, D)
Blotterpapier, 703 (Filterpapier)	VWR (Pennsylvania, USA)
Bromophenolblau 2% (Blaumarker)	siehe oben
Buffer AarI-AjiI-Bpu10I-ScaI-PasI (10x)	Thermo Fisher Scientific (Karlsruhe, D)
Buffer B (blue) (10x)	Thermo Fisher Scientific (Karlsruhe, D)
Buffer O (orange) (10x)	Thermo Fisher Scientific (Karlsruhe, D)
Buffer R (red) (10x)	Thermo Fisher Scientific (Karlsruhe, D)
Buffer Tango (yellow) (10x)	Thermo Fisher Scientific (Karlsruhe, D)
cOmplete Protease Inhibitor Cocktail	Roche Applied Science (Penzberg, D)
Desoxytrinukleotide (dNTPs)	Roche Applied Science (Penzberg, D)
Dialysemembran 10 kDa	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, D)
Difco™ Agar, Granulated	BD Biosciences (Heidelberg, D)
Dimethyl Sulfoxide	Merck (Darmstadt, D)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) (pH7)	Sigma-Aldrich (Missouri, USA)

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) (pH8), wurde selbst titriert	Sigma-Aldrich (Missouri, USA)
Entwicklerlösung 1: LumiGLO®, Reagent A (20%)	Cell signaling Technology (Massachusetts, USA)
Entwicklerlösung 2: Peroxide Reagent B (20x)	Cell signaling Technology (Massachusetts, USA)
Essigsäure (CH <sub>3</sub> COOH)	siehe oben
Ethidiumbromid	Merck (Darmstadt, D)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	siehe oben
Fetales Kälberserum (FCS)	Biowest (Nuaille, F)
Filtropur V50 500ml 0.22µm	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, D)
G-418 (Geneticin)	Sigma-Aldrich (Missouri, USA)
Glucose	siehe oben
Glutamin	Sigma-Aldrich (Missouri, USA)
Glycerol (100%)	siehe oben
Glycin 0,2 M pH3	siehe oben
Hyperfilm™ ECL™	Merck (Darmstadt, D) (früher Fisher Scientific GmbH (Schwerte, D))
Imidazol 150 mM	siehe oben
Immobilon-P Transfer Membranes, PVDF	Merck (Darmstadt, D)
Isopropylthiogalactosid (IPTG)	siehe oben
Kanamycin (25 µg/ml)	siehe oben
Magermilchpulver	siehe oben
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	siehe oben
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	siehe oben
Methanol	siehe oben

Natriumchlorid (NaCl)	siehe oben
Natriumdodecylsulfat (SDS)	siehe oben
Natriumhydrogenphosphat (Na <sup>2</sup> HPO <sup>4</sup> )	siehe oben
Natriumhydroxid (NaOH)	siehe oben
Paraformaldehyd (PFA)	siehe oben
PCR-Puffer	Thermo Fisher Scientific (Karlsruhe, D)
Proteaseinhibitor Cocktail	Böhringer Mannheim GmbH (Mannheim, D)
RPMI 1640 Medium	Pan - Biotech GmbH (Aidenbach, D)
S-Monovette <sup>®</sup> 9ml K3E	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, D)
Streptavidin RPE (0,5 mg/ml)	Dianova (Hamburg, D)
Streptomycin	Sigma-Aldrich (Missouri, USA)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	siehe oben
TALON <sup>®</sup> Metal Affinity Resin (TALON beads)	Takara Bio Europe (Clontech) (Saint-Germain-en-Laye, F)
Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan (TRIS)	Sigma-Aldrich (Missouri, USA)
TRIZMA Hydrochlorid	Sigma-Aldrich (Missouri, USA)
Trypanblau	siehe oben
Triton X-100	siehe oben
T4 DNA Ligase Buffer	Thermo Fisher Scientific (Karlsruhe, D)
Ultrafiltrations-Membranscheibe, PLTK Ultracell aus gereinigter Zellulose, 30 kDa NMGG, 63,5 mm	Merck (Darmstadt, D) (früher Millipore (Massachusetts, USA))
X-tremeGENE <sup>™</sup> HP DNA Transfection Reagent	Sigma-Aldrich (Missouri, USA)

**Tabelle 2: Chemikalien**

Die Tabelle zeigt links die Chemikalie und rechts die entsprechende Firma.

### 3.1.2.2 Puffer, Lösungen und Ähnliches

Puffer/Lösungen/Medien/Agar	Zusammensetzung
Laemmli-Puffer (10x)	144 g Glycin + 30,34 g TRIS + 10 g Natriumdodecylsulfat (SDS) + 1 l destilliertes Wasser zugeben
LB-Ampicillin/Kanamycin-Agar	10 g Tryptone + 5 g Yeast Extrakt + 10 g Natriumchlorid + 15 g Agar + 1 l destilliertes Wasser autoklavieren + 1 ml Ampicillin (100 µg/ml) / + 1 ml Kanamycin (100 µg/ml)
LB-Ampicillin/Kanamycin-Medium	10 g Tryptone + 5 g Yeast Extrakt + 10 g Natriumchlorid (NaCl) + 1 l destilliertes Wasser autoklavieren + 1 ml Ampicillin (100 µg/ml) / + 1 ml Kanamycin (100 µg/ml)
Polyacrylamid-Trenngel 10% (5 ml)	2,0 ml Aqua dest. + 1,7 ml 30% Acrylamide mix + 1,3 ml 1,5 M TRIS (pH 8,8) + 50 µl 10% Natriumdodecylsulfat (SDS) + 50 µl 10% Ammoniumperoxodisulfat (APS) + 2 µl Tetramethylethylendiamin (TEMED)
SDS-Polyacrylamid-Trenngel 12% (5 ml)	1,7 ml destilliertes Wasser + 2,0 ml 30% Acrylamide mix + 1,3 ml 1,5 M TRIS (pH 8,8) + 50 µl 10% Natriumdodecylsulfat (SDS) + 50 µl 10% Ammoniumperoxodisulfat (APS) + 2 µl Tetramethylethylendiamin (TEMED)

SDS-Polyacrylamid-Sammelmigel (1 ml)	680 µl destilliertes Wasser + 170 µl 30% Acrylamide mix + 130 µl 1,0 M TRIS (pH 6,8) + 10 µl 10% Natriumdodecylsulfat (SDS) + 10 µl 10% Ammoniumperoxodisulfat (APS) + 1 µl Tetramethylethylendiamin (TEMED)
SDS-PAGE-Probenpuffer (5x) (nicht reduzierend)	0,6 ml TRIS 1M pH 6,8 + 2,5 ml Glycerol 100% + 2 ml 10% Natriumdodecylsulfat (SDS) + 0,5 ml Bromophenolblau 2% + 3,9 ml destilliertes Wasser
SOC-Medium	20 g Tryptone + 5 g Hefe Extrakt + 0,5 g Natriumchlorid (NaCl) + 10 ml 250 mM Kaliumchlorid (KCl) pH 7,0 mit NaOH einstellen + 1 l destilliertes Wasser autoklavieren + 5 ml 2M Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )
Transferpuffer (1x)	0,3 g TRIS + 1,44 g Glycin + 20 ml Methanol + 100 ml destilliertes Wasser
TRIS-Acetat-EDTA-Puffer (TAE)	242 g TRIS + 57,1 ml Essigsäure (CH <sub>3</sub> COOH) + 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)
TRIS-Buffer-Saline (TBS)	8,75 g Natriumchlorid (NaCl) + 6,05 g TRIZMA Hydrochlorid + 1,4 g TRIS + 1 l destilliertes Wasser
TBS-Triton X	TBS + 0,1% Triton X-100

2xTY-Ampicillin-Glucose-Agar (2xTY-AG-Agar)	16 g Tryptone + 10 g Yeast Extrakt + 5 g Natriumchlorid (NaCl) + 1 l destilliertes Wasser + 15 g Agar autoklavieren + 25 ml Glucose 40% + 1 ml Ampicillin (100 µg/ml)
2xTY-Ampicillin-Glucose-Medium (2xTY-AG-Medium)	16 g Tryptone + 10 g Yeast Extract + 5 g Natriumchlorid (NaCl) + 1 l destilliertes Wasser autoklavieren + 25 ml Glucose 40% + 1 ml Ampicillin (100 µg/ml)

**Tabelle 3: Puffer und Lösungen**

Die Tabelle zeigt links den Puffer beziehungsweise die Lösung und rechts die Zusammensetzung des jeweiligen Puffers oder der Lösung.

### 3.1.2.3 Kits

Kit	Firma
Cytotoxicity Detection Kit <sup>PLUS</sup> (LDH)	Roche Applied Science (Penzberg, D)
High Pure Plasmid Isolation Kit	Roche Applied Science (Penzberg, D)
NucleoBond <sup>®</sup> Xtra Midi	Macherey-Nagel (Düren, D)
Zymoclean <sup>™</sup> Gel DNA Recovery Kit	Zymo Research (Freiburg, D)
QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies (Waldbronn, D)
TOPO <sup>™</sup> TA Cloning <sup>™</sup> Kit for Subcloning, without competent cells	Thermo Fisher Scientific (Karlsruhe, D)

**Tabelle 4: Kits**

Die Tabelle zeigt links die Namen der Kits und rechts die entsprechende Firma.

### **3.1.3 Zellen/Bakterien**

#### **3.1.3.1 Zellen**

##### **U2932 (DLBCL Zelllinie)**

Die DLBCL Zelllinie wurde mir freundlicherweise durch M-L Hansmann vom Dr. Senckenberg Institut für Pathologie der Universitätskliniken Frankfurt zur Verfügung gestellt. Die Zelllinie ist ARS2 positiv, heißt, es wurde bereits mittels Phagen-Display gezeigt, dass der B-Zell-Rezeptor der Zelllinie ARS2 bindet.

##### **HBL 1 (DLBCL Zelllinie)**

Die DLBCL Zelllinie wurde mir freundlicherweise von der Klinik für Hämatologie der Universitätsmedizin Göttingen zur Verfügung gestellt. Die Zelllinie ist ARS2 negativ, heißt, mittels Phagen-Display wurde gezeigt, dass der B-Zell Rezeptor der Zelllinie ARS2 nicht bindet.

##### **TMD 8 (DLBCL Zelllinie)**

Die DLBCL Zelllinie wurde mir freundlicherweise von der Klinik für Hämatologie der Universitätsmedizin Göttingen zur Verfügung gestellt. Die Zelllinie ist ARS2 negativ, heißt, mittels Phagen-Display wurde gezeigt, dass der B-Zell Rezeptor der Zelllinie ARS2 nicht bindet.

##### **HEK-293T (Human Embryonic Kidney Zelllinie)**

Die HEK-293T Zellen wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zelllinien in Braunschweig erworben.

#### **3.1.3.2 Bakterien**

##### **Escherichia coli DH5alpha**

Die Bakterien wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zelllinien in Braunschweig erworben.

##### **Escherichia coli TG1**

Die Bakterien wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zelllinien in Braunschweig erworben. Chromosomaler Genotyp: SupE hsdΔ5 thi Δ(lac-proAB).

## 3.1.4 DNA

### 3.1.4.1 Primer

Name	Sequenz (5' nach 3')
<b><u>Primer für die Leichtkette</u></b>	
ARS2 AA343 ApaI-s	AGT GCA CAG AAG GAA GCC AAA AAG AGT AGC
ARS2 AA466 XhoI-as	CTC GAG CCA GCC ACG ACG GAA AAA C
ARS2 AA290 ApaI-s	AGT GCA CAG GCT GGA GCA GGC CTA GGG
ARS2 AA410 XhoI-as	CTC GAG CAG CCC CGC GGC GTC CTT G
ARS2 AA260 ApaI-s	AGT GCA CAG ACG GAG AAT GAT CTT CGT
ARS2 AA375 XhoI-as	CTC GAG CTC TGA CTC CGA CTC AGA C
<b><u>Primer für die Schwerkette</u></b>	
ARS2 AA343 NcoI-s	CCA TGG CCC AAG GAA GCC AAA AAG AGT AGC
ARS2 AA466 BstE2-as	GGT CAC CCA GCC ACG ACG GAA AAA C
ARS2 AA290 NcoI-s	CCA TGG CCG CTG GAG CAG GCC TAG GG
ARS2 AA410 BstE2-as	GGT CAC CAG CCC CGC GGC GTC CTT G
ARS2 AA260 NcoI-s	CCA TGG CCA CGG AGA ATG ATC TTC GT
ARS2 AA375 BstE2-as	GGT CAC CTC TGA CTC CGA CTC AGA C
<b><u>Primer für die IgG Klonierung</u></b>	
ARS2 AA343 MunI-s	CAA TTG AAG GAA GCC AAA AAG AGT AGC
ARS2 AA343 AgeI-s	ACC GGT AAG GAA GCC AAA AAG AGT AGC
ARS2 AA466 NruI-as	TCG CGA TCC AGC CAC GAC GGA AAA AC

IgG1 Apa1-as	GGG CCC GCC GCC GCC GTT TAC CCG GAG ACA GGG A
<b><u>Primer für Mutagenese</u></b>	
TA mut Apa1-s	GCT CGA GCA TGC ATC TAG ACG GCC CAA TTC
TA mut Apa1-as	GAA TTG GGC CGT CTA GAT GCA TGC TCG AGC
ARS2 mut Sma1-s	GCC CAA CAT CTC GCG GGC CGA GAT C
ARS2 mut Sma1-as	GAT CTC GGC CCG CGA GAT GTT GGG C
ARS2 mut Eco47 3 -s	AAG GAG GAG GCC GAA GAG GCG CTC AAG G
ARS2 mut Eco47 3 -as	CCT TGA GCG CCT CTT CGG CCT CCT CCT T
3'-Antisense KDEL mut	CGA CCG GGC AGG TCA GGC TCA CCA C
<b><u>Primer Sonstige</u></b>	
CH1-3'	TGG ACG CCG CTG GTC AGG GC
CH1-5'	GCC CTG ACC AGC GGC GTC CA
CMV-Prim	TGG GAG TTT GTT TTG GCA CC
Kappa-as	TCC AGA TTT CAA CTG CTC GTC
M13 forward	GTT TTC CCA GTC ACG AC
M13 reverse	CAG GAA ACA GCT ATG AC

**Tabelle 5: Primer**

Die Tabelle zeigt links den Primer und rechts die zugehörige Sequenz von 5' nach 3'.

### 3.1.4.2 Vektoren

#### ARS2 pSfi FLAG

Im Vorfeld wurde aus der U2932 Zelllinie mit Hilfe zweier ARS2 Primer die vollständige ARS2 Sequenz amplifiziert. Diese Sequenz wurde dann anschließend in einen pSfi-FLAG Vektor (siehe pSfi FLAG) kloniert. Dieser fertige Vektor wurde mir dann freundlicherweise vom José-Carreras-Zentrum

in Homburg zur Verfügung gestellt. Er wurde dann im ersten Schritt der Arbeit als ARS2 Ursprungsvektor benutzt, um die ARS2 Sequenz daraus zu amplifizieren.

### **pCES-1 Vektor**

Der pCES-1 Vektor wurde dem José Carreras Zentrum in Homburg freundlicherweise von Hoogenboom et al. zur Verfügung gestellt [72].

Der pCES-1-Vektor ist ein Phagemid Vektor, der Bestandteil von Phagen ist. Er wurde ursprünglich zum Phagen Display verwendet, bei dem er an die Oberfläche des Phagen gebundene Fabs exprimiert. In dieser Arbeit wurde er jedoch ausschließlich zur Klonierung und anschließenden Expression von löslichen, antikörperähnlichen Konstrukten verwendet.

Der Vektor wird durch einen lacZ Promotor kontrolliert. Er enthält Gene für die konstante Domäne der Leichtkette (CL) und einer konstanten Domäne der Schwereketten (CH1). Des Weiteren bietet er die Möglichkeit, Gensequenzen an die Stelle der variablen Domäne der Leichtkette (VL), sowie an die Stelle der variablen Domäne der Schwereketten (VH) mithilfe flankierender Gensequenzen, sogenannter Schnittstellen, zu klonieren. VL wird von den Schnittstellen für die Restriktionsenzyme ApaI und XhoI flankiert, VH wiederum von den Schnittstellen für die Enzyme NcoI und BstEII.

Im Vorfeld wurde durch das José-Carreras-Zentrum an die Stellen der VL und der VH ein sogenannter Stuffer (Platzhalter) mit einer Länge von circa 1000 Basenpaaren (bp) kloniert. Dieser Stuffer besitzt unter anderem eine interne Schnittstelle für das Restriktionsenzym HindIII, die in dieser Arbeit von Bedeutung ist.

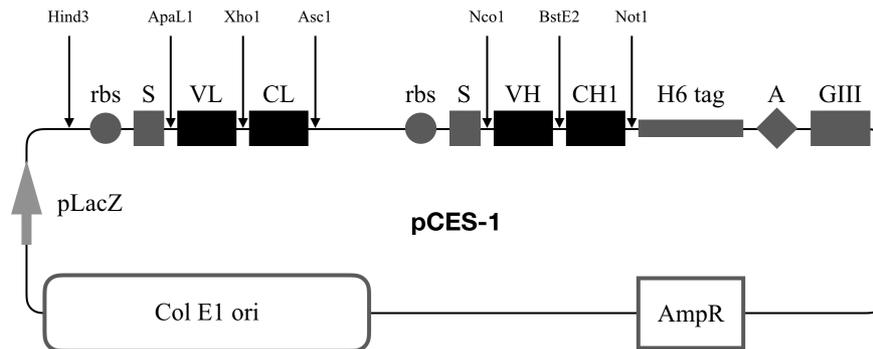
Schwereketten und Leichtketten haben jeweils eine eigene Ribosomenbindestelle, sowie eine eigene Signalsequenz. Die Leichtketten-Gene VL und CL werden somit separat von der Schwereketten exprimiert.

Der pCES 1-Vektor enthält am 3' Ende der CH1 Region ein Hexahistidin-tag (His-tag), zur späteren Anreicherung der Fabs oder antikörperähnlichen Konstrukte. Des Weiteren hat der Vektor ein Ampicillin-Resistenzgen, das der späteren Selektionierung dient.

Am 3'-Ende des His-tags ist die CH1 Sequenz über das Amber-Codon mit dem Mantelprotein-Gen (gIII) gekoppelt. Unter dem Amber-Codon versteht man ein Basentriplett, was normalerweise zum Abbruch der Translation führt. Ein sogenanntes Stopcodon. Im Fall des pCES-1 Vektors handelt es sich um die Sequenz Thymin (T), Adenin (A) und Guanin (G), also TAG. Verwendet man sogenannte Amber-Supressorstämme zur Expression, die veränderte tRNA besitzen, kann es trotzdem zur Übersetzung in eine Aminosäure kommen. Folglich bricht die Translation nicht ab und das folgende Mantelprotein gIII wird ebenfalls, verbunden mit dem restlichen Fab, exprimiert. Das Fab Konstrukt ist dann über das Mantelprotein an der Oberfläche des Phagen gebunden. Dieser Vorgang findet seine Bedeutung bei der ursprünglichen Funktion des Vektors, dem Phagen Display.

Bei Verwendung von Non-Supressorstämmen führt das Stopcodon jedoch zu einem Translationsabbruch. Infolgedessen kommt es nicht zur Expression des Mantelproteins gIII, was wiederum die Expression von löslichen Fabs zur Folge hat.

Durch die Induktion des lacZ Promotors mit IPTG kommt es jedoch trotz der Verwendung von Amber-Supressorstämmen zu einer Überexpression und damit zu einer Produktion von löslichen Fab's [87]. In dieser Arbeit wurde ausschließlich dieses Prinzip angewandt um lösliche Fab's zu produzieren.



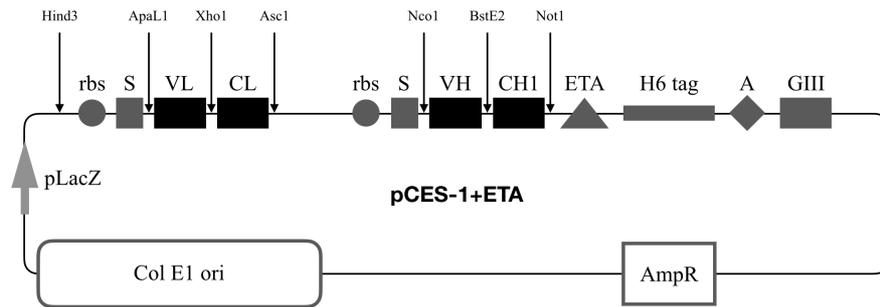
#### Abbildung 8: pCES-1 Vektor

Dargestellt ist der pCES-1 Vektor mit den zwei Ribosomenbindestellen (rbs) und den zwei Signalsequenzen (S). Des Weiteren dargestellt sind die Gene der variablen Leichtkette (VL), der konstanten Leichtkette (CL), der variablen Schwereketten (VH), sowie das Gen der Schwereketten-domäne 1 (CH1). Mit Pfeilen sind die Schnittstellen Sequenzen für die Restriktionsenzyme ApaI, XhoI, AscI, NcoI, BstE2 und NotI dargestellt. Histidin-tag (H6 tag), Amber-Codon (A), sowie Mantelproteingen-GIII (GIII) befinden sich am 3'-Ende der Schwerekette. Der Vektor besitzt ein Ampicillin-Resistenz Gen (AmpR). Der origin of replication (Col E1 ori) folgt der lacZ Promotor (pLacZ).

#### pCES-1 + ETA (beziehungsweise ETA-KDEL) Vektor

Der Vektor wurde mir freundlicherweise vom José-Carreras-Zentrum in Homburg zur Verfügung gestellt.

Es handelt sich um den schon beschriebenen pCES-1 Vektor bei dem sich am 3'-Ende der NotI Schnittstelle das ETA Toxin befindet [128]. Bei dem ETA Toxin handelt es sich um das Exotoxin A von *Pseudomonas aeruginosa*. Derselbe Vektor existiert auch mit einer modifizierten Form des ETA Toxins, dem sogenannten ETA-KDEL. Dabei handelt es sich um ein C-terminales KDEL Peptid, welches den intrazellulären Transport verbessern soll [148].



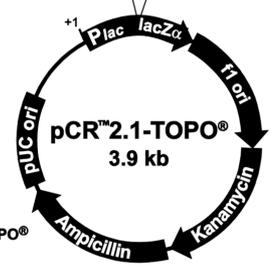
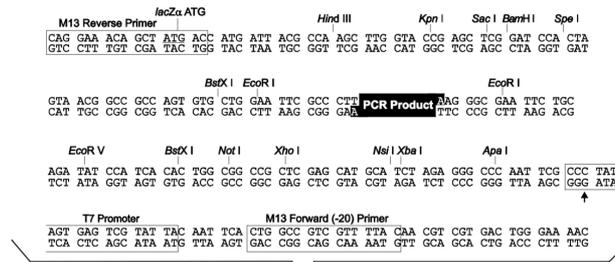
### Abbildung 2: pCES-1 + ETA Vektor

Dargestellt ist der pCES-1 Vektor mit den zwei Ribosomenbindestellen (rbs) und den zwei Signalsequenzen (S). Des Weiteren dargestellt sind die Gene der variablen Leichtkette (VL), der konstanten Leichtkette (CL), der variablen Schwereketten (VH), sowie das Gen der Schwereketten-Domäne 1 (CH1). Mit Pfeilen sind die Schnittstellen Sequenzen für die Restriktionsenzyme ApaI, XhoI, AscI, NcoI, BstE2 und NotI dargestellt. Am 3'-Ende der NotI Schnittstelle befindet sich das ETA-Toxin (ETA). Histidin-tag (H6 tag), Amber-Codon (A), sowie Mantelproteingene-GIII (GIII) befinden sich am 3'-Ende des ETA-Toxins. Der Vektor besitzt ein Ampicillin-Resistenz Gen (AmpR). Der origin of replication (Col E1 ori) folgt der lacZ Promotor (pLacZ).

### pCR 2.1-Vektor (TA-Vektor)

Der TA-Vektor ist ein linearisiertes Phagemid. Er ist 3,9 kilo Basenpaare (kbp) groß. An seinen beiden Enden hat er einen 3'-Desoxythymidin-Überhang. Das später klonierte Insert wird durch das im TA-Vektor befindliche LacZ-Operon kontrolliert. Der Vektor hat außerdem Resistenzgene für Ampicillin und Kanamycin. Des Weiteren besitzt er einen polylinker mit, das Insert flankierenden, EcoRI spezifischen, Sequenzen (Schnittstellen). Außerdem liegen nahe des Inserts Sequenzen für die beiden Primer M13 forward und M13 reverse.

Der Vektor ist erhältlich bei Thermo Fisher Scientific (Karlsruhe, D) und war Bestandteil des TOPO™ TA Cloning™ Kit for Subcloning, without competent cells.



**Comments for pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup>**  
**3931 nucleotides**

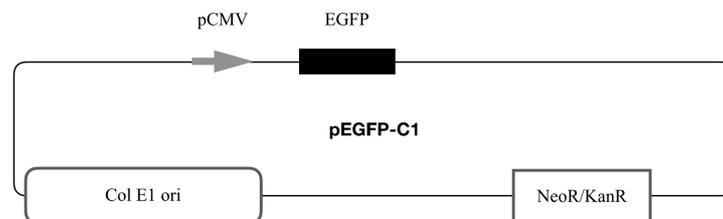
LacZα fragment: bases 1-547  
M13 reverse priming site: bases 205-221  
Multiple cloning site: bases 234-357  
T7 promoter/priming site: bases 364-383  
M13 Forward (-20) priming site: bases 391-406  
f1 origin: bases 548-985  
Kanamycin resistance ORF: bases 1319-2113  
Ampicillin resistance ORF: bases 2131-2991  
pUC origin: bases 3136-3809

**Abbildung 10: pCR 2.1-Vektor (TA-Vektor)**

Quelle: Thermo Fisher Scientific (Karlsruhe, D). Die Abbildung zeigt im oberen Teil die Basenabfolge inklusive den Restriktionsenzymen die an bestimmten Stellen schneiden. Mit schwarz markiert ist die Stelle des einzufügenden PCR-Produktes. Im unteren Teil ist der Vektor schematisch in seiner Gesamtheit dargestellt.

**pEGFP-C1 Vektor**

Der pEGFP-C1 Vektor wurde bei Clontech (Mountain View, Kalifornien, USA) käuflich erworben. Für diese Arbeit von Bedeutung ist der Vektor zum einen als Vorstufe des pSfi FLAG Tag Vektor's (siehe dort), als auch als positiv Kontrolle bei der Transfektion. Relevant ist bei der Kontrolle der Transfektion das im Vektor enthaltene enhanced green fluorescent protein (EGFP), welches bei erfolgreicher Transfektion unter einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar wird [189].

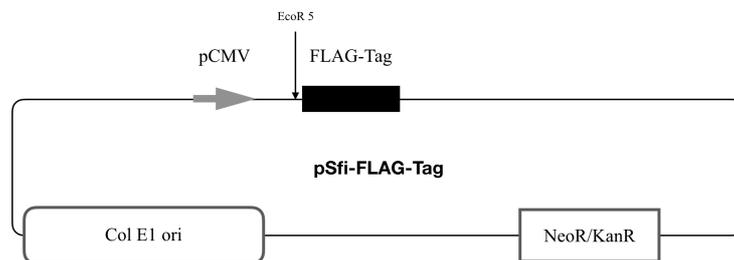


**Abbildung 11: pEGFP-C1 Vektor**

Dargestellt ist die origin of replication (Col E1 ori), sowie der CMV Promotor (pCMV). Außerdem ist das EGFP am 3'-Ende des Promotors zu erkennen.

## pSfi FLAG Tag Vektor

Der pSfi FLAG Tag Vektor wurde von G.W. Bornkamm kloniert und dem José-Carreras-Zentrum in Homburg dann freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Er ist auf der Basis des pEGFP-C1 Vektors (siehe oben) entstanden. Der Unterschied besteht darin, dass nachträglich an die Stelle des ursprünglichen EGFP der FLAG-Tag kloniert wurde [73]. Für diese Arbeit von Relevanz ist der CMV Primer, der den FLAG-Tag kontrolliert, der FLAG-Tag selbst, die dazwischen befindliche EcoR5 Schnittstelle, sowie die Resistenz gegen G-418 (Geneticin), die durch das Neomycin/Kanamycin-Resistenzgen zu Stande kommt.

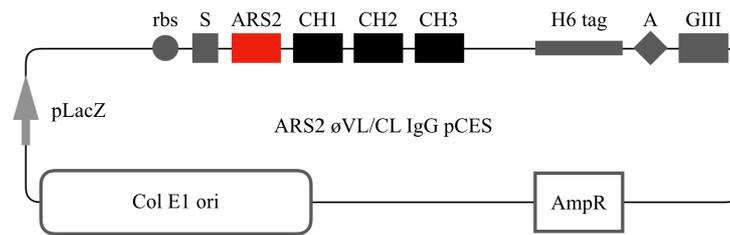


**Abbildung 12: pSfi FLAG Tag Vektor**

Abgebildet ist der pSfi FLAG Tag Vektor mit der origin of replication (Col E1 ori). Er verfügt über einen CMV Promotor (pCMV), sowie über einen FLAG-Tag. Am 5'-Ende des FLAG-Tag's befindet sich eine EcoR5 Schnittstelle (mit Pfeil markiert). Außerdem verfügt der Vektor über ein Resistenzgen, welches zu einer Neomycin, Kanamycin, sowie Geneticin (G-418) Resistenz führt (NeoR/KanR).

## ARS2 $\delta$ VL/CL IgG pCES

Zuvor wurde bereits mit Hilfe zweier Primer die komplette Sequenz der konstanten Schwereketten von humanem Immunglobulin G (konstante Domänen 1 bis 3) aus peripheral blood mononuclear cell's (PBMC's) amplifiziert. Die Sequenz wurde dann an die Stelle der Schwereketten in einem pCES-1 Vektor kloniert. Der pCES-1 Vektor besitzt außerdem eine ARS2 Sequenz (AA 343-466) an der Stelle der variablen Domäne der Schwereketten. Die Leichtkette fehlte in diesem pCES-1 Vektor. Dieser Vektor wurde mir freundlicherweise vom José-Carreras-Zentrum in Homburg zur Verfügung gestellt.

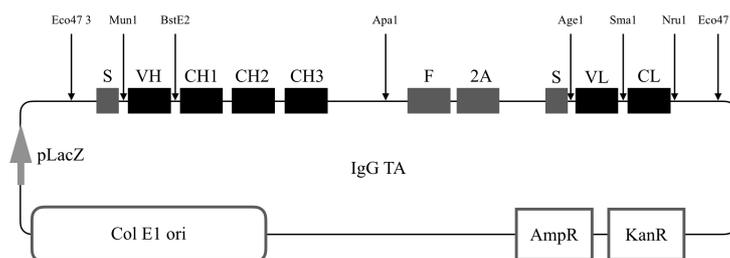


**Abbildung 13: ARS2 øVL/CL IgG pCES Vektor**

Dargestellt ist der ARS2 øVL/CL IgG pCES Vektor. Er besitzt ein Gen für die variable Domäne der Schwereketten, die durch eine ARS2 Sequenz (AA343-466) repräsentiert wird (ARS2). Außerdem besitzt er Gene für die konstanten Domänen 1 bis 3 der Schwereketten des humanen Immunglobulin G (CH1 bis CH3). Vor der Schwereketten befindet sich eine Signalsequenz (S), sowie eine Ribosomenbindestelle (rbs). Kontrolliert wird der Vektor über den LacZ Promotor (pLacZ). Es existiert außerdem ein Histidin-Tag (H6 tag), das Ambercodon (A), ein Gen für das Phagenhüllprotein (GIII), sowie ein origin of replication (Col E1 ori). Der Vektor weist außerdem ein Ampicillin Resistenzgen auf (AmpR).

### IgG TA Vektor

Der IgG TA Vektor wurde mir vom José-Carreras-Zentrum in Homburg zur Verfügung gestellt. Er wurde auf der Basis eines TA Vektors (siehe pCR 2.1 Vektor) kloniert. Er besitzt Gene für die variable Domäne und die konstanten Domänen 1 bis 3 des Immunglobulin G. Des Weiteren besitzt er Gene für die variable, sowie die konstante Domäne der Leichtkette. Die Leichtkette ist mit der Schwereketten über eine Furin-FMDV-2A selbstschneidende Sequenz verbunden. Während der Translation kommt es zuerst zu einem Schnitt am 3'-Ende der Furin-FMDV-2A Sequenz; darauf folgt dann ein Schnitt am 5'-Ende der Sequenz. Des Weiteren wurde der Vektor mit zwei Eco47 3 Schnittstellen versehen. Der Vektor wurde nach dem Vorbild der Arbeitsgruppe um Thomas Kamradt kloniert [56].



**Abbildung 14: IgG TA Vektor**

Dargestellt ist der IgG TA Vektor. Er besitzt Resistenzgene für Ampicillin (AmpR), sowie für Kanamycin (KanR). Dargestellt ist das LacZ Operon (pLacZ). Er besitzt Gene für die variable Domäne (VH), sowie die drei konstanten Domänen der Schwereketten des humanen Immunglobulin G (CH1-3). Für die Schwereketten gibt es eine Signalsequenz (S). Vor der variablen Schwereketten Domäne existiert eine Schnittstelle für Mun1, dahinter eine für BstE2. Hinter der CH3 Domäne gibt es eine Schnittstelle für Apa1. Der Vektor enthält außerdem Gene für die variable Domäne der Leichtkette (VL), sowie für die konstante Domäne der Leichtkette (CL). Auch für die Leichtkette gibt es eine Signalsequenz (S). Hinter der Signalsequenz gibt es eine Schnittstelle für Age1. Hinter der VL Domäne gibt es eine Schnittstelle für Sma1. Hinter der CL Domäne gibt es eine Schnittstelle für Nru1. Vor der Signalsequenz der Schwereketten, sowie hinter der konstanten Domäne der Leichtkette, gibt es eine Eco47 3 Schnittstelle. Die Gene der Schwere- und der Leichtkette sind über ein Furin (F) - 2A Peptid miteinander verbunden.

### 3.1.4.3 Längenmarker

#### GeneRuler 1kb DNA Ladder

Der GeneRuler 1kb DNA Ladder von Thermo Fisher Scientific (Karlsruhe, D) ist ein Längenmarker für Agarose-Gelelektrophoresen. Der Marker besteht aus 14 DNA-Fragmenten. Nachdem der Marker im Gel einer Spannung ausgesetzt ist, trennen sich die verschieden großen Fragmente ihrer Länge nach auf. Da die Länge dieser DNA-Fragmente bekannt ist, ist es möglich, daraus Schlüsse auf die Länge der DNA-Proben im restlichen Gel zu ziehen. Um den Marker in die Geltasche zu pipettieren, bedarf es zunächst einer Vorbereitung. Es wurde wie folgt vorgegangen:

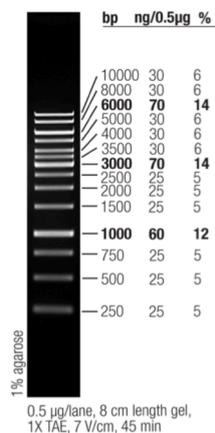
12 µl Gesamtvolumen:

0,5 µl GeneRuler 1 kbp DNA Ladder

+ 2 µl 6x DNA Loading Dye

+ 8 µl Aqua dest.

Anschließend kann der 12 µl Ansatz direkt in eine Tasche des Agarosegels pipettiert werden.



**Abbildung 15: 1kbp Längenmarker**

Quelle: Thermo Fisher Scientific (Karlsruhe, D). Die Abbildung zeigt von links nach rechts die einzelnen Banden des Längenmarkers, die Anzahl der zugehörigen Basenpaare, die Menge der jeweils verwendeten DNA und den Anteil an der Gesamtheit der DNA.

#### 50 bp DNA Ladder

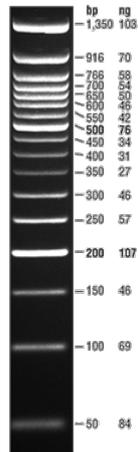
Der 50 bp DNA Ladder der New England BioLabs GmbH (NEB) (Frankfurt am Main, D) ist ein Längenmarker für Agarose-Gelelektrophoresen. Er beinhaltet 17 DNA-Fragmente, die eine unterschiedliche Anzahl an Basenpaaren vorweisen. Das kleinste Fragment besitzt 50 bp, das Größte umfasst 1350 bp. Durch Auftrennung der Fragmente nach ihrer Größe nach Anlegen einer Spannung, lassen sich Rückschlüsse auf die ebenfalls auf dem Gel gelaufenen DNA-Proben ziehen. Um den Längenmarker in die Geltasche zu pipettieren, bedarf es zunächst folgender Vorbereitung:

### 12 µl Gesamtvolumen:

2 µl Gel Loading Dye, Purple (6x), no SDS

+ 0,5 µl DNA Ladder

+ 8 µl Aqua dest.

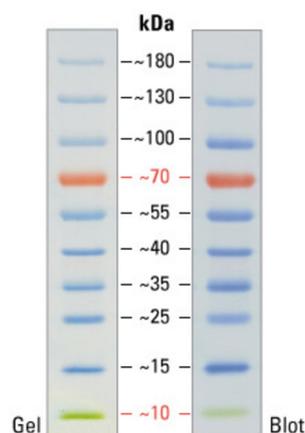


### **Abbildung 16: 50 bp Längenmarker**

Quelle: Thermo Fisher Scientific (Karlsruhe, D). Die Abbildung zeigt von links nach rechts die einzelnen Banden des Längenmarkers, die Anzahl der zugehörigen Basenpaare und die Menge der jeweils verwendeten DNA.

### **PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa**

Der Page Ruler von Thermo Fisher (Karlsruhe, D) ist ein Längenmarker für SDS Polyacrylamidgels. Er beinhaltet zehn Proteine im Bereich von 10 bis 180 kilo Dalton (kDa). Davon zwei Referenzproteine, einmal bei 70 kDa und einmal bei 10 kDa. Der Marker ist zum anschließenden blotten des Gels geeignet.



### **Abbildung 17: PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa**

Quelle: Thermo Fisher Scientific (Karlsruhe, D). Die Abbildung zeigt links den Marker auf einem Polyacrylamidgel, rechts auf einem Blot. In der Mitte ist die Menge an Protein pro Bande in kDa angegeben

### 3.1.5 Enzyme

Wenn nicht anders angegeben entsprach die Konzentration 10 U/ $\mu$ l.

Name	Firma
AmpliTaq Gold DNA Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	Thermo Fisher Scientific (Karlsruhe, D)
Age 1	Thermo Fisher Scientific (Karlsruhe, D)
Apa 1	Thermo Fisher Scientific (Karlsruhe, D)
ApaL 1	Thermo Fisher Scientific (Karlsruhe, D)
Asc 1	Thermo Fisher Scientific (Karlsruhe, D)
BstE 2	Thermo Fisher Scientific (Karlsruhe, D)
Eco47 3	Thermo Fisher Scientific (Karlsruhe, D)
EcoR 1	Thermo Fisher Scientific (Karlsruhe, D)
EcoR 5	Thermo Fisher Scientific (Karlsruhe, D)
FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (1 U/ $\mu$ l)	Thermo Fisher Scientific (Karlsruhe, D)
Hind 3	Thermo Fisher Scientific (Karlsruhe, D)
Klenow Fragment	Thermo Fisher Scientific (Karlsruhe, D)
Mun 1	Thermo Fisher Scientific (Karlsruhe, D)
Nco 1	Thermo Fisher Scientific (Karlsruhe, D)
Nru 1	Thermo Fisher Scientific (Karlsruhe, D)
Sma 1	Thermo Fisher Scientific (Karlsruhe, D)
T4 DNA-Ligase (5 U/ $\mu$ l)	Thermo Fisher Scientific (Karlsruhe, D)
Xho 1	Thermo Fisher Scientific (Karlsruhe, D)

**Tabelle 6: Enzyme**

Die Tabelle zeigt links das Enzym und rechts die entsprechende Firma.

### 3.1.6 Antikörper

Name	Firma
Anti-IgG1-APC, mouse (150 µg/ml)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
Ziege F(ab') <sub>2</sub> anti-Maus IgG (H+L)-Biotin, MinX Hu,Bo,Ho (1,2-1,4 mg/ml)	Dianova (Hamburg, D)
Goat Anti-Mouse IgG (H+L) – HRP Conjugate	Bio-Rad Laboratories (München, D)
Penta-His Antibody, BSA-free, mouse monoclonal IgG1 (0,1 µg/ml)	Qiagen (Hilden, D)
Monoclonal ANTI-FLAG® M2 antibody produced in mouse (1 mg/ml)	Merck (Darmstadt, D)

**Tabelle 7: Antikörper**

Die Tabelle zeigt links den Antikörper und rechts die entsprechende Firma.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

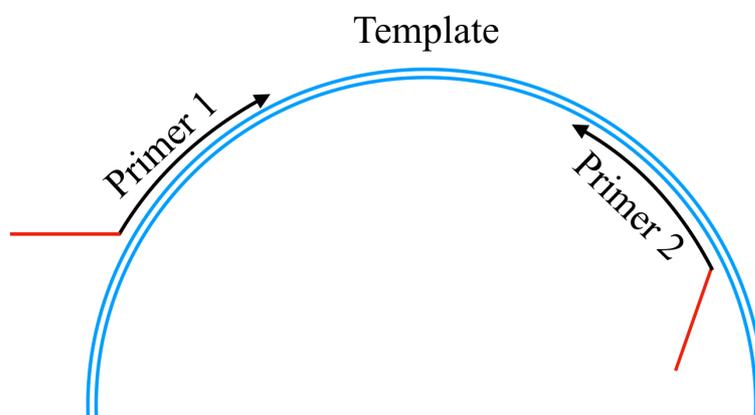
Die Polymerasekettenreaktion an DNA ist eine in vitro Methode um DNA spezifisch zu amplifizieren. Dabei wird zunächst in einem Hitzeschritt die zu amplifizierende DNA denaturiert und damit in zwei Einzelstränge zerlegt. Anschließend binden bei der Primerhybridisierung, dem annealing, (Temperatur: 60°C) zwei spezifische Oligonukleotidstränge, sogenannte Primer, an jeweils einem der denaturierten Einzelstränge. Im nächsten Schritt, der sogenannten Elongation, synthetisiert die Taq-Polymerase (eine hitzestabile Polymerase des Archeabakteriums *Thermus aquaticus*) bei 72°C DNA entlang der Primer [37]. Diese sind so konfiguriert, dass sie an den gegenüberliegenden Strängen so binden, dass die Richtung der Synthese jeweils gegenläufig ist, und somit ein zwischen den Bindestellen der Primer befindliches DNA-Stück synthetisiert wird. Durch den wiederholten Ablauf dieses Zyklus kommt es zu einer exponentiellen Vermehrung genau jenes DNA-Stückes, dessen Sequenz sich zwischen den beiden Primern befindet. Durch die hitzestabile Taq-Polymerase ist es möglich, diese Zyklen automatisiert in dafür vorgesehenen Gerätschaften durchzuführen, ohne dass die Enzymaktivität zwischendurch verloren geht.

In dieser Arbeit wurde der Veriti, 96 Well Thermal Cycler verwendet.

### 3.2.1.1 PCR zum Einfügen spezifischer Schnittstellen

Um eine DNA-Sequenz innerhalb eines Vektors in einen anderen Vektor zu klonieren, werden an beiden Enden der DNA-Sequenz spezifische Sequenzen, sogenannte Schnittstellen, benötigt. Diese Schnittstellen können dann später von dafür spezifischen Restriktionsendonukleasen geschnitten werden. Um diese Schnittstellen an den beiden Enden der DNA-Sequenz anzufügen, kann man sich die Methode der PCR zu Hilfe machen.

Die zwei Primer werden so ausgewählt, dass das eine Ende des Primers komplementär zu der zu amplifizierenden DNA ist, die sich in einem Vektor, dem sogenannten Template, befindet. Das andere Ende besteht aus der spezifischen DNA-Sequenz, die für die Schnittstelle benötigt wird. Dieses Ende bindet nicht das Template.



**Abbildung 18: Schema zur PCR zum Einfügen spezifischer Schnittstellen**

Abgebildet ist das Template von dem die gewünschte DNA amplifiziert wird. Des Weiteren sind die zwei Primer mit ihren überhängenden Sequenzen (rot), den Schnittstellen, die nicht an das Template binden, dargestellt.

Der Reaktionsansatz sah wie folgt aus:

30 µl Gesamtvolumen:

3µl PCR-Puffer

+ 1µl Senseprimer (10µM)

+ 1µl Antisenseprimer (10µM)

+ 0,2µl dNTP's

+ 0,2µl AmpliTaq Gold DNA-Polymerase

+ 1µl Template

+ 23,6µl Aqua dest.

Die PCR wurde anschließend nach folgendem Schema durchgeführt:

1 Anfängliche Denaturierung	7:00 Minuten 95°C
2 Denaturierung	0:30 Minuten 95°C
3 Primerhybridisierung	0:30 Minuten 60°C
4 Elongation	1:00 Minuten/1 kbp 72°C
Anschließend ab Schritt 2 Denaturierung 30 x wiederholen	

**Tabelle 8: PCR-Schema zum Einfügen spezifischer Schnittstellen:**

Die Tabelle zeigt links den jeweiligen Schritt der PCR und rechts die Zeit und die Temperatur, die für den entsprechenden Schritt verwendet wird.

Alle PCR Produkte haben einen 3'-Desoxyadenosinüberhang. Anschließend kann mit der Ligation in den TA Vektor fortgefahren werden.

### 3.2.1.2 Kolonien PCR

Um zu überprüfen, ob Bakterien, die beispielsweise auf Agar gewachsen sind, eine bestimmte DNA-Sequenz mit sich führen, kann man sich die Methodik der PCR zu Nutze machen. Die zwei Primer, die man bei der PCR verwendet, hängen davon ab, welchen Vektor und welchen Teil davon es zu überprüfen gilt. Sie sind so gewählt, dass Sense- und Antisense-Primer das zu überprüfende Stück flankieren.

Es wurde zunächst für jede gewachsene Kolonie eine PCR Reaktion angesetzt. Der PCR Ansatz sah wie folgt aus:

10µl Gesamtvolumen:

1µl PCR-Puffer

+0,033µl Sense Primer (100 µM)

+0,033µl Antisense Primer (100 µM)

+0,066µl dNTPs

+0,066µl AmpliTaq Gold DNAPolymerase

+8,8µl Aqua dest.

Anschließend wurde mit einer Pipettenspitze eine einzelne Kolonie auf der Agar-Platte gepickt, und dann die Spitze vorsichtig zwei bis drei Mal durch einen der Reaktionsansätze bewegt. Damit wird die zu amplifizierende DNA dem Reaktionsansatz zugefügt. Die Pipettenspitze wurde anschließend im Kühlschrank weiter aufbewahrt, um anschließend bei der Animpfung von Flüssigkulturen (3.2.3) zu dienen.

PCR:

1 Anfängliche Denaturierung	7:00 Minuten 95°C
2 Denaturierung	0:30 Minuten 95°C
3 Primerhybridisierung	0:30 Minuten 60°C
4 Elongation	1:00 Minuten/1 kbp 72°C
Anschließend ab Schritt 2 (Denaturierung) Zyklus 30 x wiederholen	

**Tabelle 9: PCR-Schema für Kolonien-PCR**

Die Tabelle zeigt links den jeweiligen Schritt der PCR und rechts die Zeit und die Temperatur, die für den entsprechenden Schritt verwendet wird.

Abschließend können die Reaktionsansätze auf ein Agarosegel aufgetragen werden (siehe 3.2.2).

### 3.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Nukleinsäuren (RNA oder DNA) nach ihrer Größe. Nach Anlage einer Gleichstromspannung wandern die negativ geladenen Nukleinsäuren auf den Pluspol zu. Das Agarose-Gel besitzt die Funktion eines Siebes und hält die größeren Moleküle stärker zurück als die kleineren und bestimmt somit die Laufgeschwindigkeit, abhängig von der Konzentration des Gels. Durch das Mitlaufen eines Längenmarkers lassen sich Rückschlüsse auf die Größe der zu untersuchenden DNA-Proben ziehen.

Angewandt wurde diese Methode in dieser Arbeit zum einen zum Nachweis von PCR Produkten, zum anderen um zuvor geschnittene Insert-DNA aus dem Gel heraus isolieren zu können.

Abhängig von der Größe der zu untersuchenden DNA wurden zwei verschiedene Agarosegel Konzentrationen verwendet, wie aus folgender Tabelle ersichtlich wird:

DNA-Größe	Gel Konzentration	Menge Agarose	Menge TAE
<500 bp	2 %	3 Gramm	150 ml
>500 bp	1 %	1,5 Gramm	150 ml

**Tabelle 10: Agarose-Gel Zusammensetzung**

Die Tabelle zeigt links die Größen der verwendete DNA. Rechts davon ist die passende Gel-Konzentration und die dafür passenden Stoffmengen zur Herstellung angegeben.

Zur Herstellung des Agarosegels wurde, je nach Konzentration, eine gewisse Menge Agarose in 150 ml TRIS-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) aufgekocht. Nach zehn Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur unter ständigem Schwenken, wurde dem flüssigen Gel 75 µl Ethidiumbromid zugegeben und das Gel in eine dafür vorgesehen Vorrichtung geschüttet. Nachdem unmittelbar danach noch Kämme für die späteren Geltaschen hinzugefügt wurden, härtete das Gel aus. Anschließend wurde das Gel in eine

Agarose-Gel Kammer gestellt, wo es von jeder Seite mit TAE Puffer umspült war. Nachdem den zu untersuchenden DNA-Proben 2µl zweiprozentiges Bromophenolblau zugegeben wurde, um die Lauffront zu markieren, wurden die Proben in die dafür vorgesehenen Geltaschen pipettiert. Nun wurde eine Spannung von 100 Volt für circa 40 Minuten an die Kammer angelegt. Anschließend wurde das Gel unter einer UV-Lampe betrachtet und mit einer Kamera ein Foto gemacht. Der zugegebene Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid lässt die DNA unter UV-Bestrahlung aufleuchten.

### **3.2.3 Vermehrung von Bakterien in Flüssigkulturen**

Um Bakterien, die in kleineren Mengen vorliegen, zu vermehren, impft man sogenannte Flüssigkulturen an, um damit später weiter arbeiten zu können (z.B. Isolierung von Plasmid-DNA). Dazu wird zunächst ein Kulturmedium vorbereitet, zudem dann die dazu passenden Bakterien gegeben werden. Anschließend lässt man die Kultur dann für zwölf bis 15 Stunden bei 37°C im Brutraum unter ständigem Schütteln inkubieren.

In dieser Arbeit wurde mit zwei verschiedenen Kulturen gearbeitet:

-LB-Ampicillin-Medium für DH 5 alpha Bakterien

-2xTY-AG-Medium für TG 1 Bakterien

Die Menge des Kulturmediums richtete sich nach der späteren Art der DNA-Isolierung. Für Minipräparationen wurden vier ml, für Midipräparationen 200 ml, verwendet. In dieser Arbeit wurden nach vorausgegangener Kolonien PCR die Bakterien in Form der Pipettenspitze (siehe 3.2.1.2) beigefügt.

### **3.2.4 Transformation von Plasmiden in Bakterien**

Die Transformation dient dazu, DNA in Form eines Plasmids in Bakterienzellen einzubringen. Nach anschließender Transformation werden die Bakterien dann auf Agar ausgestrichen. Hier macht man sich das Prinzip der Selektionierung zu Nutze. Dem Agar ist ein Antibiotikum beigegeben, was dazu führt, dass Bakterienzellen nicht wachsen. Die transformierten Vektoren haben jedoch ein Resistenzgen, wodurch sie immun gegen das Antibiotikum sind. Infolgedessen vermehren sich nur die Bakterien, die das Plasmid auch aufgenommen haben.

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Verfahren der Transformation angewandt, eines mit und eines ohne eine sogenannte Zwischenkultur. Diese ist zum Teil nötig, da die Bakterien, abhängig von dem transformierten Vektor, ihre Resistenz gegenüber dem Antibiotikum erst aufbauen müssen, bevor sie diesem ausgesetzt werden können. Welche Methode angewandt wird, hängt von dem zu transformierenden Vektor ab.

Zunächst wurden die tiefgefrorenen Bakterien 30 Minuten langsam auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 100 µl Bakterien zusammen in einem Eppendorfgefäß (Eppi) dem Vektor hinzugefügt und

direkt wieder für 30 Minuten auf Eis gelegt. Danach folgte der Hitzeschritt bei dem das Eppi für eine Minute bei 42°C in ein Wasserbad gestellt wurde. Dieser Schritt dient dazu, dass die Bakterien den Vektor aufnehmen können. Anschließend wurde wieder fünf Minuten auf Eis inkubiert. Danach folgte nun fakultativ die Zwischenkultur. Dafür wurden 200 µl SOC-Medium dazu gegeben, und nochmal eine Stunde bei 37°C inkubiert. Zuletzt wurden die Bakterien dann auf Agar ausgestrichen. Welcher Agar verwendet wurde, hing von dem transformierten Vektor und den Bakterien ab.

## **3.2.5 Methoden zur Isolation von DNA**

### **3.2.5.1 Isolierung von Plasmid-DNA durch Minipräparation**

Um Plasmid-DNA aus über Nacht gewachsenen vier ml Bakterienkulturen zu isolieren, wurde das High Pure Plasmid Isolation Kit von Roche Applied Science verwendet. Unter der Methode der alkalischen Lyse wurde die DNA nach den Vorgaben des Herstellers und unter Benutzung der im Kit enthaltene Substanzen und Materialien isoliert [22].

### **3.2.5.2 Isolierung von Plasmid-DNA durch Midipräparation**

Um Plasmid-DNA in größeren Mengen aus Flüssigkulturen zu isolieren, wurde das NucleoBond®Xtra Midi Kit von Macherey-Nagel (Düren, D) verwendet. Die Menge der über Nacht gewachsenen Flüssigkultur betrug 200 bis 400 ml. Die DNA wurde mit Hilfe der im Kit enthaltenen Chemikalien und Materialien nach der Methode der alkalischen Lyse isoliert. Die einzelnen Arbeitsschritte entsprachen der vom Hersteller angegebenen Vorgehensweise [22].

### **3.2.5.3 Isolierung geschnittener DNA**

Um DNA, die zuvor durch Restriktionsenzyme geschnitten worden ist, von anderen überflüssigen Substanzen zu isolieren, wurde das Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit verwendet. Mit Insert-DNA, die in Agarose-Gel gebunden vorlag, wurde genauso vorgegangen wie mit Vektor-DNA, die nicht in Form eines Agarose-Gels gebunden war. Verfahren wurde so, wie es der Hersteller des Kits angegeben hatte.

## **3.2.6 Photometrische Methoden**

### **3.2.6.1 Konzentrationsbestimmung von DNA**

DNA-Konzentrationen lassen sich photometrisch bestimmen. Dazu misst man die Extinktion einer DNA-haltigen Probe bei 260 nm. Bildet man den Quotienten der Extinktionen von 260 und 280 nm, erhält man ein Maß für die Reinheit der Probe.

In dieser Arbeit wurde das Nano-Drop Spectrophotometer von Peqlab Biotechnologie (Erlangen, D) benutzt.

Um die DNA-Konzentration von zuvor isolierter DNA zu bestimmen, wurde zuerst mit zwei  $\mu\text{l}$  destilliertem Wasser ein Referenzwert für die Messung bestimmt. Nun wurden zwei  $\mu\text{l}$  der zu messenden Lösung auf die Messvorrichtung pipettiert. Die DNA-Konzentration wird nun anhand der Extinktion bestimmt und kann abgelesen werden.

### **3.2.6.2 Konzentrationsbestimmung von Protein**

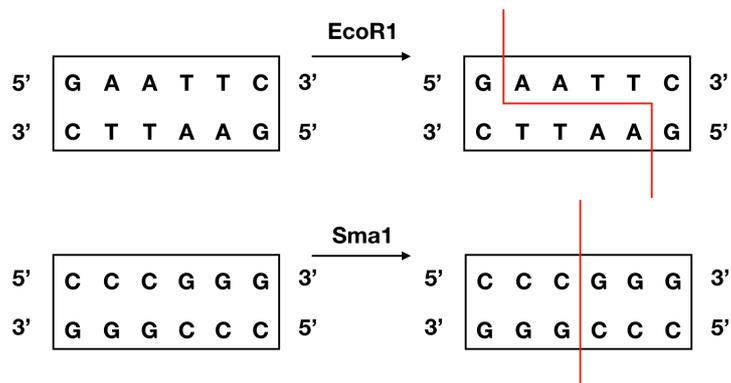
Hierzu wurde das Photometer Gene Quant pro von Amersham plc (Little Chalfont, UK) verwendet. Die Wellenlänge, bei der gemessen wurde, betrug 280 nm. Als Referenzreagenz wurde PBS pH8 verwendet. Zum Messen der Probe sind 100  $\mu\text{l}$  in eine Quarzküvette, ohne das Entstehen von Luftblasen, pipettiert worden.

## **3.2.7 Klonierungsprozeduren**

Der Begriff des Klonierens bezeichnet im Allgemeinen die Vervielfältigung von identischen DNA-Sequenzen. Im engeren Sinne bezeichnet man damit den Prozess, bei dem eine bestimmte DNA-Sequenz in einen Vektor eingebracht wird und durch diesen dann vervielfältigt werden kann.

Um Gensequenzen von einem in einen anderen Vektor zu klonieren, macht man sich in einem ersten Schritt die Hilfe sogenannter Restriktionsendonukleasen zu Nutze. Diese schneiden DNA an gewissen, für jedes Enzym spezifischen Sequenzen, den sogenannten Schnittstellen. Diese bestehen meist aus vier bis acht Basenpaaren, die eine palindromische Sequenz darstellen. Meist liegt die Gensequenz um die es geht so vor, dass sie links und rechts jeweils von zwei verschiedenen Schnittstellen flankiert wird (siehe 3.2.1). Auch im Zielvektor müssen dann die Schnittstellen genau an den Stellen vorhanden sein, zwischen denen später die Gensequenz liegen soll.

Man unterscheidet zwei Arten von Restriktionsenzymen: Solche, die blunt ends erzeugen, und solche, die sticky ends erzeugen. Schneidet man die vorliegende DNA und den Zielvektor mit Enzymen, die sticky ends erzeugen, muss darauf geachtet werden, dass die Enzyme zueinander passen. Meistens werden, der Einfachheit halber, die gleichen Enzyme für die DNA-Sequenz und den Vektor verwendet. Schneidet man die Gensequenz und den Zielvektor mit Enzymen, die blunt ends erzeugen, passen die Enden in jedem Fall aufeinander.



**Abbildung 19: Schema zur Reaktion von Restriktionsenzymen mit sticky ends sowie mit blunt ends**

**Oben:** Dargestellt ist die Reaktion des Restriktionsenzym *EcoRI*, die sticky ends erzeugt. Der rote Strich zeigt die Stelle des Schnittes. **Unten:** Dargestellt ist die Reaktion des Enzyms *SmaI*, welche blunt ends erzeugt. Der rote Strich zeigt die Stelle des Schnittes.

Nachdem man den Ursprungsvektor sowie auch den Zielvektor mit beiden Restriktionsenzymen hat reagieren lassen, erhält man zum einen die Insert-DNA, die aus dem Ursprungsvektor geschnitten wurde, sowie die Vektor-DNA mit einer passenden Lücke, die aus dem Zielvektor hervorgeht. Nun isoliert man zunächst die Insert-DNA vom übrigen Teil des Ursprungsvektor mit Hilfe eines Agarose Gels und bereitet zugleich die Vektor-DNA auf die bevorstehende Ligation vor (entweder ebenfalls mit Hilfe eines Agarosegels oder mit Hilfe der FastAP). Anschließend wird nun Insert-DNA und Vektor-DNA miteinander ligiert, was das Einfügen der Insert-DNA in die Vektor-DNA bedeutet. In dem fertigen Zielvektor befindet sich dann die benötigte Gensequenz an der vorbestimmten Stelle.

Des Weiteren können Vektoren auch lediglich mit einem Restriktionsenzym geschnitten werden, wenn keine im Vektor befindliche DNA herausgeschnitten werden soll, sondern nur DNA in den Vektor eingefügt werden soll.

Auch die Selbstligation (Re-Ligation), also ohne das Einbringen von Insert-DNA, von zuvor geschnittenen Vektoren (beziehungsweise DNA) ist möglich (siehe 3.2.7.6). Folgend sind die Prozeduren im Einzelnen beschrieben:

### 3.2.7.1 Ligation des pCR 2.1 Vektors (TA Vektor)

Die Ligation des TA Vektors mit Produkten aus der PCR mit Hilfe des TOPO™ TA Cloning™ Kit for Subcloning, without competent cells von Thermo Fisher Scientific (Karlsruhe, D), nimmt im Vergleich zu den anderen, in dieser Arbeit durchgeführten Klonierungsmethoden, eine gewisse Sonderstellung ein. Nachdem DNA mit Hilfe einer PCR amplifiziert worden ist, kann sie direkt in einen Vektor kloniert werden. Der Vektor kann dann wiederum von Bakterien vermehrt werden. Der TA Vektor ist linearisiert und besitzt an seinen beiden Enden einen 3'-Desoxythymidin-Überhang. Dadurch lassen sich die PCR Produkte, die einen 3'-Desoxyadenosinüberhang besitzen, direkt als Insert in den Vektor einfügen. Der

Vektor hat eine intrinsische Polymerase Aktivität, wodurch sich die Zugabe einer zusätzlichen Ligase erübrigt.

Es wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

2µl DNA

+ 0,5µl Salt Solution

+ 0,4µl pCR 2.1 Vektor

Anschließend wurde fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Plasmid wurde nun relativ zeitnah in Bakterien transformiert (siehe 3.2.4).

### **3.2.7.2 Reaktion von DNA mit Restriktionsendonukleasen**

Die Menge an DNA sollte jeweils circa zwei µg betragen. Der Reaktionsansatz sah wie folgt aus:

30 µl Gesamtvolumen:

3 µl Reaktionspuffer (je nach Enzymen)

+ 1 µl Restriktionsendonuklease 1

+ 1 µl Restriktionsendonuklease 2 (entfällt gegebenenfalls bei Reaktion mit nur einem Enzym)

+ 2 µg DNA

+ Rest mit destilliertem Wasser auffüllen

Anschließend reagierte der Ansatz eine Stunde bei 37°C im Brutraum. Danach wurde die Insert-DNA über eine Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die Vektor-DNA zur Ligation vorbereitet (3.2.7.3 und 3.2.7.4).

### **3.2.7.3 Auftrennung geschnittener Insert-DNA oder Vektor-DNA mit Hilfe eines Agarose Gels**

Nachdem die DNA geschnitten wurde, enthält das Reaktionsgefäß nun zum einen die benötigte Insert-DNA und zum anderen den übrig gebliebenen Teil des ursprünglichen Vektors. Um nun beides voneinander zu trennen, wurde ein Agarosegel geladen (siehe dort). Nachdem das Gel gelaufen war, wurde unter der UV-Lampe die Insert-DNA mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und in ein zwei ml Eppi gelegt. Anschließend wurde die Insert-DNA aus dem Gel isoliert (siehe 3.2.5.3). Mit der Vektor-DNA kann, alternativ zu der Reaktion mit der FastAP, auch so vorgegangen werden. Nach Auftrennen der zuvor geschnittenen Vektor-DNA, wird diese von der übrig gebliebenen DNA mittels Agarose Gel getrennt, die Vektor-DNA aus dem Gel ausgeschnitten und aus dem Gel isoliert (siehe 3.2.5.3).

### 3.2.7.4 Vorbereiten der Vektor-DNA auf die Ligation mittels FastAP

Dieser Schritt erfolgt nur bei anschließender Ligation mit Insert-DNA. Bei der Selbstligation entfällt dieser Schritt und es werden zunächst, wenn nötig, die Schnittstellen angepasst (siehe 3.2.7.6) oder es wird lediglich, wie bei 3.2.5.3 beschrieben, die Vektor-DNA nach der Reaktion mit den Restriktionsenzymen isoliert und anschließend mit der Selbstligation fortgeföhren.

Das Reaktionsgefäß enthält nun zum einen den benötigten Zielvektor und gegebenenfalls, bei Reaktion mit zwei Restriktionsenzymen, ein kleineres, nicht benötigtes DNA-Stück, das sich zwischen beiden Schnittstellen befand. Man gibt nun 1 µl FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase dazu. Diese hydrolysiert die 5'-Phosphate des Vektors und der restlichen DNA und verhindert so die spontane Re-Ligation der Vektor-DNA, für die eines der beiden freien Enden der DNA 5'-Phosphate besitzen müsste. Somit werden in diesem Fall die 5'-Phosphate der Insert-DNA benötigt. Nachdem man das Enzym circa zehn Minuten bei 37°C im Brutraum hat reagieren lassen, wurde die DNA wie in 3.2.5.3 beschrieben isoliert.

### 3.2.7.5 Ligation

Für die Ligation wurde ein Verhältnis von Vektor-DNA zu Insert-DNA von 1 mol : 2 mol bis 1 mol : 3 mol verwendet. Zum Berechnen wurde der NEBioCalculator<sup>TM</sup><sub>v.1.8.1</sub> von New England BioLabs (Frankfurt, D) verwendet. Für die Menge an Vektor-DNA wurden in der Regel zwischen 50 und 100 ng gewählt. Daraus errechnete sich dann die Menge der verwendeten Insert-DNA. Zu jedem Ligationsansatz wurde immer zusätzlich eine Kontrolle gemacht, der kein Insert zugegeben wurde, um später nach der Transformation die Anzahl der Kolonien auf den Agarplatten miteinander vergleichen zu können. Daraus ließen sich erste Rückschlüsse auf den eventuellen Erfolg der Ligation ziehen. Die Reaktionsansätze sahen wie folgt aus:

Ligation:

10 µl Gesamtvolumen:

- Vektor-DNA (Menge je nach Reaktion)
- + Insert-DNA (Menge je nach Berechnung)
- + 1 µl T4-DNA-Ligase
- + 1 µl T4-DNA-Ligase Buffer
- + Rest mit destilliertem Wasser auffüllen

Kontrolle:

10 µl Gesamtvolumen:

- Vektor-DNA (Menge je nach Reaktion)
- + 1 µl T4-DNA-Ligase

- + 1 µl T4-DNA-Ligase Buffer
- + Rest mit destilliertem Wasser auffüllen

Nach Mischen der Reaktionsgefäße inkubierte die Reaktion zwölf bis 15 Stunden bei Raumtemperatur. Danach sollte die ligierte DNA zeitnah transformiert werden.

### **3.2.7.6 Selbstligation**

In gewisser Weise als Spezialfall anzusehen ist die sogenannte Selbstligation, bei der ein zuvor geschnittener Vektor wieder mit sich selbst re-ligiert, ohne das Insert-DNA zugegeben wurde.

Nachdem der Vektor mit den Restriktionsenzymen geschnitten wurde, muss zunächst entschieden werden, ob die DNA-Enden angeglichen werden müssen (siehe 3.2.7.6). Anschließend wurde die Vektor-DNA, wie in 3.2.5.3 beschrieben, isoliert.

Der Reaktionsansatz für die Ligation sah dann, nach Isolation der DNA, folgendermaßen aus:

10 µl Gesamtvolumen:

- Vektor-DNA (Menge je nach Reaktion)
- + 1 µl T4-DNA-Ligase
- + 1 µl Ligationspuffer
- + Rest mit destilliertem Wasser auffüllen

Nach Mischen des Reaktionsgefäßes inkubierte die Ligation zwölf bis 15 Stunden bei Raumtemperatur. Im Anschluss daran wurde transformiert.

### **Anpassen der Schnittstellen**

Wenn die Vektor-DNA zuvor mit einem oder zwei Restriktionsenzymen geschnitten wurde, welche blunt ends erzeugen oder mit zwei Restriktionsenzymen geschnitten wurde, welche zueinander passende sticky ends erzeugen, so ist bei der weiteren Selbstligation nichts zu beachten.

Wurde die Vektor-DNA jedoch von zwei Restriktionsenzymen geschnitten, die unterschiedliche, nicht zueinander passende sticky ends, erzeugt haben, muss man vor der Selbstligation und auch vor der Vorbereitung der Vektor-DNA noch einen weiteren Schritt voranstellen, nämlich das Anpassen der Schnittstellen. Diese Reaktion erfolgt im Anschluss an die Reaktion des Vektors mit den Restriktionsendonukleasen.

Um zwei verschiedene sticky ends innerhalb eines Vektors so zu modifizieren, dass man diesen mit sich selbst ligieren lassen kann, verändert man die sticky ends. Dazu macht man sich das Klenow-Fragment zu Nutze. Es katalysiert die Reaktion, in der sticky ends zu blunt ends werden, die dann im Anschluss

problemlos miteinander ligiert werden können. Die korrekte Durchführung der Prozedur war den Angaben des Herstellers zu entnehmen. Es konnte dann mit der Isolation der DNA, wie in 3.2.5.3 beschrieben, fortgefahren werden und dann im Anschluss ligiert werden.

### **3.2.7.7 Mutagenese**

In dieser Arbeit wurden die Mutagenesen mit Hilfe des QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit durchgeführt.

Die Mutagenese dient der erwünschten Veränderung bestimmter Gensequenzen. Das Prinzip der Mutagenese beruht wesentlich auf dem der Polymerasekettenreaktion. Es werden zwei Primer verwendet, die komplementär zu dem Template sind, das verändert werden soll. Die zu verändernde Base oder Basenabfolge ist bei den Primern jedoch schon vorhanden. Wird nun die Zeit, die die Taq Polymerase zum Amplifizieren hat, so gewählt, dass der ganze restliche Vektor amplifiziert werden kann, ist das Produkt der PCR der ganze vorherige Vektor, jedoch mit den zu verändernden Stellen. Im Anschluss daran wird dann eine Reaktion mit dem Restriktionsenzym DpnI durchgeführt. Dieses Enzym reagiert mit methylierter DNA, was wiederum der direkt aus Bakterien stammenden DNA entspricht, und verdaut diese. Als Ergebnis dieser Reaktion bleibt nur die neu mit Hilfe der PCR synthetisierte DNA übrig. Die Prozedur, sowie die verwendeten Materialien sind den Angaben des Herstellers des Kits zu entnehmen. In dieser Arbeit wurde ausschließlich das „QUICK-REFERENCE PROTOCOL“ verwendet.

### **Kontrolle von Schnittstellen Mutagenesen**

Möchte man den Erfolg von Mutagenesen kontrollieren, die eine Schnittstelle für Restriktionsenzyme eliminiert haben sollen, bietet es sich an, dies mit Hilfe einer Kolonien-PCR zu machen. Nachdem der mutagenisierte Vektor, wie im Protokoll beschrieben, transformiert und ausplattiert wurde, sind mehrere Kolonien der Platte gepickt worden und mit diesen eine Kolonien-PCR, mit dazu passenden Primern, links und rechts der mutagenisierten Sequenz, durchgeführt worden. Als Kontrolle wurden jeweils zwei Proben mit dem ursprünglichen nicht mutagenisierten Vektor mit amplifiziert. Dazu wurden jeweils 0,02 ng des Vektors dem PCR Ansatz dazu gegeben. - Jeweils eine der Kontrollproben wird bei der späteren Enzymreaktion nicht mit Enzym versetzt und somit auch nicht geschnitten. - Nach nun gelaufener PCR wurde nun folgender Reaktionsansatz mit den einzelnen PCR Produkten (außer jeweils einer der beiden Kontrollen pro Vektor) pipettiert:

Gesamtvolumen 20 µl:

10 µl PCR Produkt

+ 2 µl Reaktionspuffer

+ 0,3 µl Restriktionsenzym

+ 7,7 µl Aqua dest.

Anschließend inkubierte die Reaktion eine Stunde bei 37°C im Brutraum.

Als Restriktionsenzym wurde jenes gewählt, für welches die Sequenz mit der Mutagenese eliminiert werden sollte. Der Puffer richtete sich danach.

Die Produkte konnten nun anschließend, nachdem sie mit zwei µl zweiprozentigem Bromophenolblau versehen wurden, auf ein Agarosegel aufgetragen werden und dann im Anschluss ausgewertet werden.

Die erfolgreichen Mutagenesen weisen nun dieselbe Bande auf, wie auch jeweils die Kontrolle, die nicht mit Enzym geschnitten worden ist. Hat die Mutagenese jedoch nicht funktioniert, hat die Bande dieselbe Lauflänge, wie die Bande der mit Restriktionsenzym geschnittenen Kontrolle.

## **3.2.8 Zellkultur**

### **3.2.8.1 Kultivierung**

Zur Kultivierung befanden sich die Zellen in einem HERAcell 240 CO<sub>2</sub> Inkubator von Heraeus (Hanau, D) bei 37°C und einem CO<sub>2</sub> Gehalt von 5 %.

Die Zellen wurden in RPMI 1640 Medium kultiviert, dem zwei mmol/l Glutamin zugegeben wurde. Damit betrug die Gesamtkonzentration an Glutamin vier mmol/l. Außerdem wurde dem Medium FCS in einer zehnpromzentigen Konzentration hinzugefügt.

Je nach eventuell transfizierten Konstrukten wurde zur Selektion G-418 (Genitacin) in einer Konzentration von 500 µg/ml dem Kulturmedium hinzugefügt (näheres im Ergebnisteil).

In regelmäßigen Abständen wurde das Medium erneuert. Die Zellen wurden, sobald sie konfluent am Boden der TC-Flaschen gewachsen waren, gesplittet. Dazu wurde frisches Medium in einer neuen TC-Flasche vorgelegt. Nun wurde in einem Verhältnis von 1:5 bis 1:10, je nachdem wie schnell die Zellen gewachsen waren, die Zell-Überstand-Suspension aus der vorherigen TC-Flasche hinzugefügt.

### **3.2.8.2 Zellzahl Bestimmung**

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Neubauer-Zählkammer der Firma Eppendorf (Hamburg, D) verwendet.

Zunächst wurden 50 µl einer zu überprüfenden Zellsuspension zusammen mit 50 µl Trypanblau, welches vorher 1:10 mit 0,6prozentigem Natriumchlorid verdünnt worden war, in ein Eppli gegeben. Die Anzahl der Zellen in der Suspension pro ml errechnete sich nun aus der Summe der Anzahl der Zellen aus zwei gegenüberliegenden Quadranten der Kammer multipliziert mit 10000.

### 3.2.8.3 Transfektion

Transfektion bezeichnet den Vorgang, bei dem DNA in eukaryontische Zellen gebracht wird. Zusätzlich zu der zu transfezierenden DNA wurde immer auch eine Positiv Kontrolle (EGFP) und eine Negativ Kontrolle (hier wird weder DNA noch Transfektionsreagenz zugegeben) durchgeführt.

Bei erfolgreicher Transfektion des EGFP (grün fluoreszierendes Protein) kann selbiges unter dem Fluoreszenzmikroskop dargestellt werden. Damit ist zwar nicht sichergestellt, dass die Transfektion auch bei der restlichen DNA erfolgreich war, bei Versagen der EGFP Transfektion kann jedoch dafür ein allgemeines Transfektionsproblem vermutet werden.

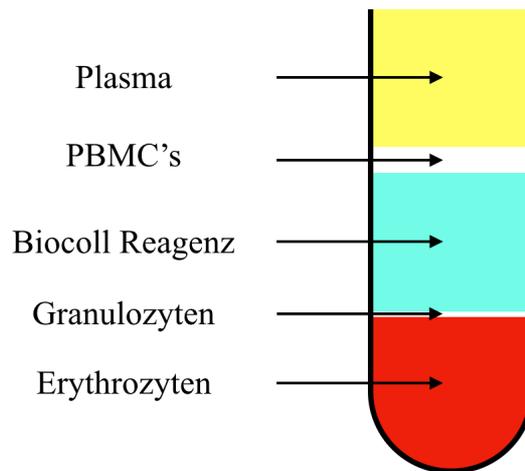
Transfeziert wurde in 24-Well-Platten. Zur Transfektion wurde eine Zellkonzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml verwendet. Dazu wurde die Zellzahl zuerst, wie in 3.2.8.2 beschrieben, bestimmt. Die Zellen wurden dann bei 1500 Umdrehungen pro Minute (rpm) vier Minuten zentrifugiert. Der Überstand mit dem alten Medium wurde verworfen. Anschließend wurde dann neues RPMI 1640 Medium (mit 4 mmol/l Glutamin, zehnpotentem FCS) in der benötigten Menge, um die Konzentration zu erreichen, den Zellen zugegeben.

In jedem Well wurde nun ein ml reines RPMI 1640 vorgelegt und anschließend ein ml der Zellsuspension (Konzentration=  $1 \times 10^6$  Zellen/ml) dazugegeben. Die Zellen inkubierten dann für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

Einer neuen 24-Well Platte wurden jeweils pro Well drei µg der zu transfezierenden DNA hinzugegeben. Anschließend wurde pro Well 100 µl reines RPMI 1640 dazugegeben. Dann wurde im Verhältnis vorgelegte DNA-Menge (in Gramm) : Transfektionsreagenz = 1:3, X-tremeGENE™ HP DNA Transfection Reagent von Sigma-Aldrich (Missouri, USA) zugegeben. Nach zehnminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden dann 100 µl dieser Lösung vorsichtig auf die über Nacht inkubierten Zellen gegeben. Die Zellen inkubierten nun mindestens 48 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

### 3.2.8.4 Isolation und Kultivierung von PBMC's

Unter PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) versteht man einkernige Zellen des Blutes mit rundem Zellkern. Um diese zu gewinnen, wurde zunächst venöses Blut mit einer Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) enthaltenen Monovette (S-Monovette® 9ml K3E) abgenommen. Unter sterilen Bedingungen wurden dann zunächst sieben ml Biocoll Reagenz (Dichte 1,077 g/ml) in ein Falcon gegeben. Im Anschluss wurde in einem 1:1 Verhältnis (sieben ml) das zuvor gewonnene Vollblut vorsichtig auf die Reagenz pipettiert. Nun wurde für 30 Minuten bei 1600 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Es war darauf zu achten, dass die Bremse der Zentrifuge ausgeschaltet wurde, um ein Vermischen der verschiedenen Bestandteile zu verhindern. Durch den Dichtegradienten kam es nun zu einer Trennung der verschiedenen zellulären Bestandteile des Vollblutes.



**Abbildung 20: Trennung der Blutbestandteile nach Zentrifugation durch Dichtegradient**

In der Abbildung sind der Reihe nach die einzelnen Bestandteile, die durch den Dichtegradienten voneinander getrennt werden konnten, dargestellt. Zu erkennen sind Plasma, PBMC's, Biocoll Reagenz, Granulozyten sowie Erythrozyten.

## 3.2.9 Proteinanalytische Methoden

### 3.2.9.1 Induktion

Eine Erhöhung der Proteinsyntheserate durch Stimulation der Transkription des dafür zuständigen Gens wird als Induktion bezeichnet. Um die fertig klonierten und in Bakterien transformierten Konstrukte weiter testen zu können, war es erforderlich, die Bakterien, die die jeweiligen Plasmide enthielten, zu induzieren.

Man benötigt eine über Nacht gewachsene vier ml Flüssigkultur. Diese wurde nun 1:100 in einem frischen Kulturmedium (selbiges wie zur Flüssigkultur benutzt) verdünnt und anschließend bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurde die Kultur im Photometer bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen, um den Moment abzugreifen, bei dem die Extinktion zwischen 0,6 und 0,8 liegt. Als Referenzwert für die Messung wurde die Extinktion des Kulturmediums gesetzt. Anschließend wurde dann mit Isopropylthiogalactosid (IPTG) induziert. Das IPTG bindet am lacZ Promotor und verdrängt dort Repressoren. Das führt dazu, dass die Region, die durch das lacZ Operon kontrolliert wird, vermehrt exprimiert wird [24]. Es wurde IPTG 1 milimolar (mM) zugegeben. Dann inkubierte die Kultur für vier Stunden bei 30°C auf einem Schüttler. In dieser Zeit wird das Protein vermehrt produziert. Anschließend wurde die Kultur für eine Minute bei 14300 rpm abzentrifugiert. Die Bakterien und die Proteine befinden sich nun im Pallett. Der Überstand wurde verworfen.

### **3.2.9.2 Vorbereitung TALON beads**

Die TALON beads sind eine Matrix, auf der Cobalt gebunden ist. Sie dienen dazu, His-tags zu binden. Das wird sich zu Nutze gemacht um damit Proteine zu isolieren (siehe Isolation von Protein mit His tag) [26].

Es wurden 100 µl Matrix in ein Eppi pipettiert (die beads liegen standardmäßig 50-prozentig vor). Nun wurden die beads mit PBS pH8 gewaschen (100 µl beads eine Minute bei 14300 rpm zentrifugieren, dann den Überstand verwerfen und anschließend 1 ml PBS pH8 dazugeben und wieder zentrifugieren). Dieser Vorgang wurde zwei bis drei Mal wiederholt. Nach dem letzten Verwerfen des Überstandes wurden nochmal 100 µl PBS pH8 dazu gegeben, so dass die beads letztendlich wieder 50-prozentig vorlagen. Das erleichterte das anschließende Pipettieren der beads.

### **3.2.9.3 Vorbereitung Anti-FLAG Matrix**

Vom José-Carreras-Zentrum in Homburg wurde mir eine Matrix, an die der FLAG-Tag Antikörper Monoclonal ANTI-FLAG® M2 antibody produced in mouse von Merck (Karlsruhe, D) gebunden ist, zur Verfügung gestellt (Die Matrix liegt standardmäßig 50-prozentig vor). Die Bindekapazität der Matrix beträgt 10 mg/ml. Eine, zur erwarteten Proteinmenge passende Menge (meist ca. 150 µl) dieser Matrix, wurde dann mit PBS pH 7 zwei Mal gewaschen (Das pipettierte Volumen 1 Minute bei 14300 rpm zentrifugieren, dann den Überstand verwerfen, anschließend 1 ml PBS pH7 dazugeben und wieder zentrifugieren; zwei Mal wiederholen). Anschließend wurde mit PBS pH7 die Matrix wieder 50-prozentig verdünnt, um sie besser pipettieren zu können. Im Anschluss konnte mit der Proteinisolation fortgefahren werden.

### **3.2.9.4 Isolation von Protein mit Polyhistidin-Tag (His-Tag)**

Durch die Induktion werden Bakterien zur Produktion von Protein stimuliert. Da die Bakterien aber nicht spezifisch nur ein gewünschtes Protein produzieren können, macht man sich zum Beispiel den Polyhistidin-Tag (His-Tag) zu Nutze. Er besteht aus einer Abfolge von mindestens sechs Histidinen, die dazu in der Lage sind, Nickel- oder Cobalt-Ionen in einem Chelatkomplex zu binden. Proteine exprimieren einen His-tag dann, wenn vorher die notwendige DNA-Sequenz in der für das Protein kodierenden Gensequenz vorliegt. Der His-tag wurde sich in dieser Arbeit bei einigen der Konstrukte zu Nutze gemacht [26].

Die vorher induzierten vier ml Bakterien Kulturen wurden auf Eis gestellt, sowie auch das PBS pH8. Dann wurde 1 ml PBS pH8 zu den Bakterien im Eppi dazu gegeben. Das PBS enthält unter anderem Proteaseinhibitoren, die verhindern, dass Protein verdaut wird. Anschließend wurde das Pellet im zugegebenen PBS pH8 mittels Vortex resuspendiert. Dann wurde die Suspension eine halbe Stunde auf Eis gestellt und anschließend eine halbe Stunde bei 4°C bei 14300 rpm zentrifugiert. In dem Überstand

befindet sich jetzt das Protein. Dieser gesamte Überstand wurde jetzt zu den vorher vorbereiteten TALON beads gegeben. Nun wurde unter ständigem leichtem Schütteln bei 4°C im Kühlraum inkubiert. In dieser Zeit binden die His-Tags mit samt der Proteine an die beads. Anschließend wurde das Eppi eine Minute bei 14300 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, da jedes Protein, das einen His tag besitzt, nun an den TALON beads gebunden ist, die sich wiederum am Boden des Gefäßes befinden. Nun wurde drei Mal mit PBS pH8 gewaschen (1 ml PBS pH8 dazugeben, eine Minute bei 14300 rpm zentrifugieren, den Überstand verwerfen; drei Mal wiederholen). Um besagte Proteine nun von den beads wieder frei zu lösen, wurden 200 µl 150 mM Imidazol dazugegeben. Nach fünfminütigem ständigem Schwenken des Eppi's, wurde im Anschluss wieder eine Minute bei 14300 rpm zentrifugiert. Alles Protein mit einem His tag befindet sich nun im Überstand. Dieser Überstand wurde nun zunächst in ein neues Eppi überführt. Da der zum Eluieren verwendete Imidazolpuffer jedoch nicht physiologisch ist, wurde das Protein noch umgepuffert. Eine Dialysemembran 10 kDa von SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, D) wird unter den Deckel des Eppi's geklemmt, in das man zuvor ein Loch gestochen hat. Das Eppi wurde anschließend mit dem Deckel nach unten auf einem Schwimmer in einem Becherglas mit 1,5 liter (l) PBS pH7 platziert. Nach zwölf bis 15 Stunden Inkubationszeit bei 4°C im Kühlraum kommt es durch Diffusion zu einem Austausch der Puffer im Eppi, sodass sich am Ende das isolierte Protein, in PBS Ph7 gepuffert, befindet.

### **3.2.9.5 Isolation von Protein mit FLAG-Tag**

Bei dem FLAG-Tag handelt es sich um eine acht Aminosäuren lange Sequenz, die sich als Bestandteil von Proteinen zu Nutze gemacht wird, um diese zu isolieren und anzureichern [73]. Durch die kleine Größe und die hydrophilen Eigenschaften der Sequenz hat der FLAG-Tag wenig Auswirkungen auf die spätere Aktivität des Proteins. Mit Hilfe von Antikörpern, die an eine Matrix kovalent gebunden sind, in dieser Arbeit der Anti-FLAG Matrix, kann der FLAG-Tag inklusive Protein gebunden, isoliert, angereichert und dann später wieder eluiert werden.

Dieses Prinzip wurde sich in dieser Arbeit bei einigen der Konstrukte zu Nutze gemacht.

50 ml des Zellkulturüberstands, der das Protein enthält, wurden mit 150 µl der reinen vorbereiteten Matrix versehen und inkubierten dann über Nacht bei 4°C unter ständiger Bewegung auf einem Rollgerät. Dabei wird das Konstrukt an die Matrix gebunden. Anschließend wurde bei 3500 rpm zehn Minuten zentrifugiert, um die Matrix inklusive Protein am Boden zu sammeln. Der Überstand wurde verworfen und die Matrix in ein Eppi überführt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS pH7 wurden dann 200 µl 0,2 M Glycin zum Eluieren zugegeben. Durch leichtes Schütteln löst sich das Konstrukt nun wieder von dem an der Matrix gebundenen Antikörper. Durch Zentrifugieren bei 12000 rpm für eine Minute wird die Matrix, wieder ohne Protein, nun am Boden gesammelt. Der Überstand mit dem enthaltenen Konstrukt wurde in ein neues Eppi überführt. Um den pH-Wert zu neutralisieren, wurden 20 µl 1 M Natriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}^2\text{HPO}^4$ ) hinzugefügt. Um das Konstrukt wieder von dem

Glycin zu trennen, was bei der späteren Analyse stören würde, wurde der Deckel des Eppis durchstochen und mit einer Dialysemembran 10 kDa von SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, D) versehen. Nun konnte das Eppi mit dem Deckel nach unten über Nacht bei 4°C in 1,5 l PBS pH7 gestellt werden. Durch Diffusion kommt es nun zum Austausch und das Konstrukt befand sich anschließend gepuffert in PBS pH7.

### **3.2.9.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient dazu, Proteine ihrer Molekülmasse nach aufzutrennen. Das Natriumdodecylsulfat (SDS) ist ein anionisches Tensid, das sich gleichmäßig an das Protein anlagert und somit die Eigenladung des Proteins, die durch unterschiedliche Aminosäurebeschaffenheiten entsteht, überdeckt. Die nun gleichmäßig negativ geladenen Proteine wandern nach Anlegen einer Gleichstromspannung zum Pluspol. Außerdem kommt es durch die wechselseitige Abstoßung zwischen den SDS Molekülen, aufgrund ihrer negativen Ladung, zu einer Linearisierung der Proteine, was eine Auftrennung dieser nach ihrer Molekülmasse ermöglicht, da längere Proteinketten von dem Polyacrylamidgel stärker zurückgehalten werden als kürzere.

Zur Elektrophorese wurde ein Trenngel (5 ml) und ein darüber befindliches Sammelgel (1 ml) verwendet. Je nach Proteingröße wurde ein zehnzprozentiges oder zwölfprozentiges Trenngel verwendet (siehe 3.1.2.2). Das Sammelgel, in dem die Polyacrylamidkonzentration geringer und damit die Laufgeschwindigkeit größer als in dem Trenngel ist, dient dazu, die verschiedenen Proteine in den nebeneinander gelegenen Slots in einer Ebene zu fokussieren. Dadurch werden am Ende die Banden abgrenzbarer. Das Trenngel dient dann anschließend zum Auftrennen der verschiedenen Proteine, wie oben beschrieben, nach ihrer Größe. Zunächst wurden zwei spezielle Glasplatten, die einem Abstand von 75 mm zueinander haben, mit Alkohol gereinigt und aneinandergelegt. Dann wurde das Polyacrylamid-Trenngel (5 ml) zwischen die beiden Glasplatten gegossen. Die Stärke des Trenngels richtete sich nach der Größe der Proteine. Es ist darauf zu achten, dass dies unmittelbar nach dem Anmischen des Gels passiert, da nach Zugabe von APS und TEMED die Mischung beginnt, zu polymerisieren. Anschließend wurde das Trenngel mit destilliertem Wasser überschichtet. Nach 30 bis 40 Minuten Wartezeit ist das Gel vollständig polymerisiert. Das überschichtete destillierte Wasser kann abgeschüttet werden und anstelle dessen das Polyacrylamid-Sammelgel (1 ml) gegossen werden. Hier ist wie beim Gießen des Trenngels zu verfahren, mit dem Unterschied, dass unmittelbar nach dem Gießen ein Platzhalter für die Slots, in die später die Proben pipettiert werden, von oben in das gegossene Sammelgel gesteckt wird. Nachdem auch das Sammelgel nach 30 bis 40 Minuten ausgehärtet ist, kann man den Platzhalter herausnehmen. Das Gel wird inklusive der Glasplatten in die Gelkammer gestellt. Die Kammer wurde mit Laemmli-Puffer 1x befüllt. Der Proteinprobe wurde dann der nicht reduzierende SDS-PAGE-Probenpuffer 5x in einem Verhältnis von 1:5 hinzugegeben (das Protein denaturiert nicht). Es wurde mit acht µl Proteinprobe gearbeitet.

Die Proben wurden dann in jeweils einen Slot pipettiert. Außerdem wurde in einen Slot der Marker PageRuler™ Prestained Protein Ladder pipettiert, um später aus der gelaufenen Länge der Probe die Proteingröße bestimmen zu können. Es wurde eine Spannung von 200 Volt an die Kammer angelegt, bei der sich die Proben dann circa 40 Minuten innerhalb des Gels aufgetrennt haben. Anschließend kann man zur Darstellung der Proteine das Gel blotten (siehe 3.2.9.7).

### **3.2.9.7 Western Blot**

Beim Western Blotting werden Proteine aus zuvor durchgeführten Polyacrylamidgelelektrophoresen durch ElektrobloTTing-Verfahren auf eine proteinbindende Membran (hier: Immobilon-P Transfer Membranes, PVDF) übertragen. Es wurde ein „semi-dry“ Verfahren angewandt. Verwendet wurde eine Blotting-Apparatur der Firma Bio-Rad (Trans-Blot SD, semi-dry transfer cell). Zunächst wurde die PVDF Membran für fünf bis zehn Minuten in reinem Methanol aktiviert. Danach wurde die Membran zum equilibrieren in Transferpuffer (1x) gelegt. Des Weiteren werden zwei Filterpapiere benötigt, die auch in Transferpuffer (1x) getränkt wurden. Um nun zu blotten, wurde zunächst das Filterpapier, darauf die vorbereitete PVDF Membran, darauf das gelaufene Gel und darauf wiederum Filterpapier auf die Blotting-Apparatur gelegt. Nun wurde überschüssige Flüssigkeit durch Druck entfernt (—> Semi-dry) und die Apparatur mit dem Deckel verschlossen. Es wurde eine Spannung von 23 Volt bei einem Strom von 450 Milliampere (bei zwei Membranen: 24 Volt, 480 Milliampere) für 30 bis 40 Minuten an das Gerät angelegt. Das Protein ist nun auf der Membran gebunden. Anschließend wurde die PVDF Membran direkt in der Immunfärbung (siehe 3.2.9.8) weiter benutzt oder im Kühlraum bei 4°C in TBS-Triton X gelagert.

### **3.2.9.8 Immunfärbung von PVDF Membranen**

Möchte man die zuvor mittels Western Blot auf die Membran übertragenen Proteine nun sichtbar machen und damit auch nachweisen können, bedient man sich einer Immunfärbung.

Um die PVDF Membran spezifisch mit Antikörpern zu färben, wurde die zuvor geblottete Membran (siehe Western Blot) zunächst in 50 ml zehnpromzentiger Magermilch (auf Basis von TBS-Triton X) geblockt. Dazu wurde die Membran für vier Stunden bei Raumtemperatur auf einem Schüttelgerät in Magermilch gelegt. Das dient dazu, das Auftreten von unspezifischen Bindungen zu verhindern. Dann wurde die Membran zwei bis drei Mal mit TBS Triton X gewaschen. Der nun verwendete primäre Antikörper richtete sich nach der Art des Konstruktes. Bei Konstrukten, die einen His-tag enthalten, wurde der Penta-His Antibody, BSA-free, mouse monoclonal IgG1 von Qiagen (Hilden, D) verwendet, der das His-tag des Proteins bindet. Er wurde 1 : 2000 in zehn ml TBS-Triton X verdünnt. Bei Konstrukten, die einen FLAG-Tag besitzen, wurde der Monoclonal ANTI-FLAG® M2 antibody produced in mouse von Merck (Karlsruhe, D) verwendet. Er wurde 1:2500 in zehn ml TBS-Triton X verdünnt. Um welchen Antikörper es sich jeweils handelte ist im zugehörigen Ergebnisteil beschrieben.

Die Membran wurde dann in jene zehn ml für circa eine Stunde bei Raumtemperatur auf ein Schüttelgerät gestellt. Anschließend wurde drei bis vier Mal mit TBS Triton X gewaschen. Als sekundärer Antikörper wurde der Goat Anti-Mouse IgG (H+L) – HRP Conjugate verwendet, der an den primären Antikörper bindet, da es sich um einen Antikörper handelt, der an Maus Schwerkettenproteine bindet. Der sekundäre Antikörper verfügt über Peroxidase Aktivität, die anschließend bei der weiteren Darstellung dient. Er wurde 1:3000 in zehn ml TBS-Triton X verdünnt. Anschließend wurde die Membran in diesen zehn ml für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer Petrischale auf ein Schüttelgerät gestellt. Danach wurde wieder drei bis vier Mal mit TBS Triton X gewaschen.

Zum weiteren Darstellen wurden zunächst 100 µl der Entwicklerlösung 1 (LumiGLO®, Reagent A (20%)) mit 100 µl der Entwicklerlösung 2 (Peroxide Reagent B (20x)) mit zwei ml destilliertem Wasser gemischt. Diese Mischung wurde dann auf die Membran gegeben. Anschließend wurde die Membran zwischen eine Klarsichtfolie gelegt, um den Kontakt der Chemikalien mit anderen Materialien zu verhindern. In einem Dunkelraum wurde nun Hyperfilm™ ECL™ von Merck (Darmstadt, D) (früher Fisher Scientific GmbH (Schwerte, D)) auf der Klarsichtfolie und damit auch auf der darunter gelegenen Membran platziert. Durch die am Antikörper und somit auch am Protein gebundenen Peroxidase reagiert das Luminol in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid zu einem instabilen Dianion, wodurch es zur Chemilumineszenz kommt. Das emittierte Licht wird dann auf dem Hyperfilm dargestellt. Nach fünf bis zehn Minuten wurde der Hyperfilm zunächst in Adefo Mix Sa Entwickler von Adefo-Chemie GmbH (Neu-Isenburg, D), der vorab 1:5 verdünnt wurde, gelegt. Nach drei bis fünf Minuten wurde der Hyperfilm wieder herausgenommen und mit Wasser abgewaschen. Anschließend wurde der Hyperfilm wiederum für drei bis fünf Minuten in Adefo Mix Sa Fixierer, ebenfalls von Adefo-Chemie GmbH (Neu-Isenburg, D) und 1:5 verdünnt, fixiert. Danach wurde der Film wieder mit Wasser abgewaschen.

### **3.2.9.9 Konzentrierung von Protein in Lösung**

Um mit relativ niedrig konzentrierten Proteinen in Lösung vernünftig weiterarbeiten zu können, war es gegebenenfalls notwendig, diese Lösungen höher zu konzentrieren, um so die Menge an Protein pro Volumeneinheit zu erhöhen. Dazu wurde die jeweilige Lösung zunächst mit Hilfe des Filtropur V50 500ml 0.22µm von Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, D) vorfiltriert, um eventuelle gröbere Verunreinigungen zu entfernen. Im Anschluss wurde dann zur eigentlichen Konzentrierung ein Amicon Stirred Ultrafiltration Cell Model 202 verwendet, welches mit fünf bar betrieben wurde. Als Filtermembran diente die Ultrafiltrations-Membranscheibe, PLTK Ultracell aus gereinigter Zellulose, 30 kDa NMGG, 63,5 mm.

## 3.2.10 Durchflusszytometrische Analysen

### 3.2.10.1 Immunfärbung von Zellen vorbereitend zur Durchflusszytometrie

Die Immunfärbung von Zellen nach Inkubation mit den zu überprüfenden Konstrukten dient der Vorbereitung zur späteren Messung mittels Durchflusszytometrie. In dieser Arbeit wurde so Verfahren, dass nach anfänglicher Inkubation der Zellen mit den zu überprüfenden Konstrukten zunächst ein primärer Antikörper zugegeben wurde. Bei Konstrukten mit His-Tag handelte es sich um den Antikörper Penta-His Antibody, BSA-free, mouse monoclonal IgG1 von Qiagen (Hilden, D); bei Konstrukten mit FLAG-Tag um den Monoclonal ANTI-FLAG® M2 antibody produced in mouse von Merck (Karlsruhe, D). Diese binden dann wiederum jeweils an den His-Tag beziehungsweise FLAG-Tag der auf den Zellen gebundenen Konstrukte. In einem nächsten Schritt wurde dann ein sekundärer Antikörper verwendet, der wiederum selbst an den zuvor verwendeten primären Antikörper bindet. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene sekundäre Antikörper verwendet:

- Ziege F(ab')<sub>2</sub> anti-Maus IgG (H+L)-Biotin, MinX Hu,Bo,Ho von Dianova (Hamburg, D) (im Folgenden Anti-mouse Biotin AK genannt)
- Anti-IgG1-APC, mouse von Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)

Bei dem Anti-IgG1-APC, der bereits den Fluoreszenzfarbstoff besitzt (siehe unten), kann im Anschluss mit der FACS Analyse fortgefahren werden. Bei dem Anti-mouse Biotin AK musste noch ein weiteres, Streptavidin enthaltenes, tertiäres Konstrukt hinzugegeben werden. Es wurden folgende 2 Streptavidin Konstrukte verwendet:

- BD Pharmingen™ APC Streptavidin von BD Biosciences (Heidelberg, D)
- Streptavidin RPE von Dianova (Hamburg, D)

Das Streptavidin geht eine sehr starke Bindung mit dem am sekundären Antikörper gebundenen Biotin ein. Ein Streptavidin Molekül kann vier Biotin Moleküle binden. An das Streptavidin ist ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt.

Je nach Analyse wurden in dieser Arbeit zwei unterschiedliche Farbstoffe verwendet. Zum einen R-Phycoerythrin und zum anderen Allophycocyanin (APC):

- R-Phycoerythrin absorbiert Licht unterschiedlicher Wellenlängen und emittiert dann wiederum Licht mit einem Maximum bei einer Wellenlänge von 578 nm.
- APC absorbiert Licht bei einem Maximum von 633 nm und emittiert Licht mit einem Maximum bei einer Wellenlänge von 680 nm.

Die Emission der beiden Fluoreszenzfarbstoffe konnte dann später in der Durchflusszytometrie zur Detektion verwendet werden.

Die Immunfärbung wurde in dieser Arbeit in Vorbereitung zweier verschiedener durchflusszytometrischer Untersuchungen verwendet. Zum einen der Oberflächenfärbung und zum anderen der Intrazellulärfärbung.

### **Oberflächenfärbung**

Bei der Oberflächenfärbung liegt das Interesse der späteren Analyse entweder an der möglichen Bindung der Konstrukte auf der Oberfläche oder der Internalisierung selbiger. Dazu inkubieren die zu untersuchenden Konstrukte zunächst für eine bestimmte Zeit mit den Zellen. Die Inkubationstemperatur lässt sich als zusätzliche Größe ebenfalls variieren. Beide Faktoren werden in Bezug zur jeweiligen Fragestellung festgelegt. Im Ergebnisteil ist bei jeder Oberflächenfärbung die gewählte Zeit, Temperatur und damit auch die Fragestellung angegeben. Es wird davon ausgegangen, dass mit Annäherung der Temperatur an 37°C sowie mit weiter fortgeschrittener Zeit die Wahrscheinlichkeit der Internalisierung der Konstrukte steigt.

### **Intrazellulärfärbung**

Bei der Intrazellulärfärbung liegt das Interesse der späteren Analyse in einer möglichen Internalisierung und damit intrazellulären Anreicherung der Konstrukte. Dazu inkubieren die Konstrukte ebenfalls für eine bestimmte Zeit bei einer bestimmten Temperatur mit den Zellen. Anschließend folgt nun ein Fixierschritt, indem die Zellen für zehn Minuten bei Raumtemperatur mit zweiprozentigem Paraformaldehyd (PFA) fixiert werden, was eine spätere Färbung der Oberfläche im Übrigen auch nicht mehr möglich macht. Zur Permeabilisierung der Zellen wird nun für zehn Minuten 0,5-prozentiges Saponin in PBS pH7 den Zellen hinzugegeben. Das Saponin führt dazu, dass die für die Färbung notwendigen Substanzen das Innere der Zelle erreichen können [25]. In den nachfolgenden Schritten, die denen der Oberflächenfärbung entsprechen, ist den verwendeten Medien (Antikörper sowie auch Waschpuffer) auch immer 0,1-prozentiges Saponin hinzuzugeben, um die Permeabilität aufrecht zu erhalten.

### **Methodik der Färbungen**

Es wurden  $5 \times 10^4$  bis  $1 \times 10^5$  Zellen in ein Rundbodenröhrchen pipettiert. Dann wurden die Zellen mit PBS pH7 gewaschen, indem zuerst ein ml PBS pH7 hinzugefügt wurde, dann drei Minuten bei 1800 rpm zentrifugiert wurde, und der Überstand anschließend verworfen wurde. Dieser Waschvorgang wurde zwei Mal nacheinander durchgeführt. Jedem Röhrchen wurden dann zehn  $\mu\text{g}$  des zu überprüfenden Konstrukts hinzugegeben. Dann mit dem Vortex gemischt und je nach Fragestellung und Färbung, wie oben beschrieben, inkubiert. Nun folgte, fakultativ bei der Intrazellulärfärbung, die Fixierung (siehe oben). Danach wurde einmal mit einem ml PBS pH7, wie oben beschrieben,

gewaschen. Als nächstes wurde dann der primäre Antikörper verdünnt und 50 µl der angesetzten Lösung den Zellen hinzugefügt.

Der Penta-His Antibody, BSA-free, mouse monoclonal IgG1 von Qiagen (Hilden, D) für die His-Tag Konstrukte wurde 1:500 in PBS pH7 verdünnt.

Der Monoclonal ANTI-FLAG® M2 antibody produced in mouse von Merck (Karlsruhe, D) für die FLAG-Tag Konstrukte wurde ebenfalls 1:500 in PBS pH7 verdünnt.

Nach Mischen mit dem Vortex wurde wieder für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde wieder einmal mit einem ml PBS pH7 gewaschen. Als nächstes wurde dann der sekundäre Antikörper, teilweise vorher verdünnt, den Zellen hinzugefügt.

Der Anti-mouse Biotin AK von Dianova (Hamburg, D) wurde 1:200 in PBS pH7 verdünnt. Es wurden 50 µl hinzugefügt.

Der Anti-IgG1-APC, mouse von Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D) wurde unverdünnt in einer Menge von fünf µl hinzugefügt.

Es wurde wieder mittels Vortex gemischt und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde erneut einmal mit einem ml PBS pH7 gewaschen und bei Verwendung des Anti-IgG1-APC mit einem ml PBS pH7 resuspendiert und mit der durchflusszytometrischen Messung fortgefahren.

Gegebenenfalls, bei Verwendung des Anti-mouse Biotin AK, wurde nun noch eines der beiden Streptavidin Konstrukte hinzugefügt. Diese wurden ebenfalls verdünnt und in einer Menge von 50 µl hinzugefügt:

Streptavidin RPE wurde 1:500 in PBS pH7 verdünnt.

APC Streptavidin wurde 1:500 in PBS pH7 verdünnt.

Nach Mischen mittels Vortex wurde für circa zwölf Minuten inkubiert und anschließend zwei Mal mit jeweils einem ml PBS pH7 gewaschen. Zum Schluss wurden die Zellen jeweils noch einmal mittels einem ml PBS pH7 resuspendiert. Anschließend wurde mit der Durchflusszytometrie fortgefahren.

Bei jeder Analyse wurde zusätzlich eine Messung und damit auch eine Färbung der Zellen ohne vorherige Inkubation mit einem der Konstrukte durchgeführt, um die jeweilige Zelllinie vor den eigentlichen Messungen zu kalibrieren (Leerwert) (siehe 3.2.10.2).

### **3.2.10.2 Durchflusszytometrie (FACS)**

Die Durchflusszytometrie ermöglicht es, einzelne Zellen in sehr kurzer Zeit in Bezug auf Größe, Granularität und die Expression von Antigenen zu untersuchen. Das eröffnet die Möglichkeit, viele Informationen in relativ kurzer Zeit über ganze Zell-Populationen zu erhalten.

Voraussetzung für die Durchflusszytometrie ist, dass sich die Zellen in einer Einzelzellsuspension befinden. Dazu werden die Zellen mittels Fokussierung durch einen Hüllstrom zusammen mit einer Trägerflüssigkeit in den Mikrokanal einer hochpräzisen Küvette gebracht. Dadurch kann anschließend jede Zelle einzeln nacheinander mit einem Laser bestrahlt werden. Nun können zwei verschiedene

Signale von einem Detektor erfasst werden, zum einen das Streulicht und zum anderen das unter Umständen vorhandene Fluoreszenzsignal.

Das nach Bestrahlung der Zelle resultierende Streulicht, was durch die Zellbeschaffenheit gegeben ist, kann in Vorwärtsstreulicht (forward scatter = FSC) und Seitwärtsstreulicht (side scatter = SSC) unterteilt werden. Das FSC ist ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel und lässt Rückschlüsse auf die Größe der Zelle ziehen. Das SSC ist ein Maß für die rechtwinklige Brechung des Lichts und lässt unter anderem Rückschlüsse auf die Granularität der Zelle ziehen. Die beiden Parameter FSC und SSC können in einem Dot Plot ausgewertet werden, in welchem jeder Punkt eine Zelle repräsentiert.

Ein Fluoreszenzsignal entsteht dann, wenn Fluoreszenzfarbstoffe auf der Zelle gebunden sind. Indem man die Zellen zuvor mit Fluoreszenzfarbstoff tragenden Antikörpern behandelt, kann man dadurch die Expression von Antigenen, oder wie in dieser Arbeit die Bindung von Antikörpern beziehungsweise antikörperähnlichen Konstrukten, auf der Zelle nachweisen. Durch die Bestrahlung des Farbstoffs mittels Laser einer bestimmten für den Farbstoff charakteristischen Wellenlänge, kommt es zur Absorption und infolgedessen wiederum zur Emission eines Lichts einer bestimmten, auch für den Stoff charakteristischen, Wellenlänge. Dieses Licht kann dann detektiert werden. Die Ergebnisse der Fluoreszenzmessung können in einem Histogramm dargestellt werden.

Der Begriff Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS) wird meist im Sinne von Durchflusszytometrie verwendet, obwohl bei der Durchflusszytometrie im Gegensatz zum FACS auf die Sortierung von Zellen verzichtet wird. In dieser Arbeit wurde auch auf das Sortieren von Zellen verzichtet. Der Einfachheit halber wird nachfolgend trotzdem von FACS gesprochen.

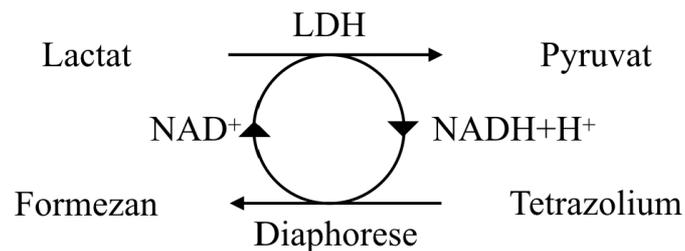
Die Durchflusszytometrie diente in dieser Arbeit zum einen der Bindungsanalyse und zum anderen der Intrazelluläranalyse der verschiedenen Konstrukte (siehe Immunfärbung von Zellen in Vorbereitung zur Durchflusszytometrie).

Zur Messung wurde das BD FACS Canto™ Flow Cytometer von BD Biosciences (Heidelberg, D) verwendet. Bei dem verwendeten Fluoreszenzfarbstoff, der in der Immunfärbung verwendet wurde, handelt es sich um Phycoerythrin mit einem Emissionsmaximum bei einer Wellenlänge von 578 nm. Die Immungefärbten Zellen (siehe Immunfärbung) wurden in einem Rundbodenröhrchen in die FACS Apertur gestellt. Vor den eigentlichen Messungen jeder Zellreihe wurden zunächst Zellen der jeweiligen Zellreihe ohne vorherige Inkubation mit einem der Konstrukte gemessen (Leerwert). Anhand dieser Messung wurde das FACS kalibriert, um dann im Anschluss die einzelnen Messungen durchzuführen. Durchgeführt wurden die Messungen mit Hilfe des Computerprogramms FACSDiva™ BD Biosciences (Heidelberg, D). Der späteren Auswertung diente das Programm WinMDI (Freeware, entwickelt von Joe Trotter).

### 3.2.11 LDH Zytotoxizitäts Assay

Das Laktatdehydrogenase (LDH) Zytotoxizitäts Assay dient dem Quantifizieren der Zelllyse. In dieser Arbeit wurde dazu das Cytotoxicity Detection Kit<sup>PLUS</sup> (LDH) von Roche Applied Science (Penzberg, D) verwendet.

Die LDH ist ein Enzym, welches in Zellen im Zytoplasma vorkommt. Kommt es nun zu einer Zellschädigung, wird das Enzym in den Extrazellulärraum freigegeben. In diesem Assay nutzt man diesen Sachverhalt, indem man, katalysiert durch die freigesetzte LDH, zugegebenes Lactat zu Pyruvat reagieren lässt. Bei dieser Reaktion wird außerdem zugegebenes  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH}^++\text{H}^+$  reduziert. In einem zweiten Reaktionsschritt wird dann ein Tetrazoliumsals mit Hilfe des Enzyms Diaphorese zu einem Formezansalz umgewandelt. Enzym sowie Salz müssen wiederum vorher zugegeben werden. Bei dieser Reaktion wird das vorher entstandene  $\text{NADH}^++\text{H}^+$  nun wieder zu  $\text{NAD}^+$  oxidiert. Die Menge an Laktatdehydrogenase ist somit proportional zu der Menge an entstandenem  $\text{NADH}^++\text{H}^+$  und somit auch proportional zu der Menge an entstandenem Formezan. Die Menge Formezan kann nun anschließend photometrisch gemessen werden.



**Abbildung 21: Schema der Umwandlung von Tetrazolium zu Formezan in Bezug zum LDH Zytotoxizitäts Assay**

Das Schema zeigt die Umwandlung von Lactat mit Hilfe der Laktatdehydrogenase (LDH) und Nicotinamidadenindinukleotid<sup>+</sup> ( $\text{NAD}^+$ ) zu Pyruvat und  $\text{NADH}^++\text{H}^+$ . In einem zweiten Schritt wird dann ein Tetrazoliumsals, katalysiert von dem Enzym Diaphorese, in Beisein von  $\text{NADH}^++\text{H}^+$  zu Formezan umgewandelt.

In dieser Arbeit diente das Assay der Überprüfung der Zelltoxizität einiger der Konstrukte. Zu Beginn wurden die zu untersuchenden Zellen, sowie gegebenenfalls die verwendeten PBMC's, mit RPMI 1640 Medium gewaschen, da sich in den ursprünglichen Kulturmedien fetales Kälberserum (FCS) befindet, welches wiederum LDH enthält. Dazu wurde den Zellen RPMI 1640 Medium zugegeben und bei 1500 rpm drei Minuten lang zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde zwei Mal wiederholt. Zum weiteren Arbeiten wurde eine 96-Well-Platte benutzt. Es wurden generell immer dreifach Bestimmungen durchgeführt.

Das Gesamtvolumen des Inhalts jedes Well betrug zunächst 100  $\mu\text{l}$ . Jedes Well enthielt 5000 Target Zellen. Für die Analyse wurden nun die jeweiligen zu überprüfenden Konstrukte in unterschiedlichen Konzentrationen, je nach Analyse, den Zellen hinzugefügt.

Bei Konstrukten, die nicht direkt toxisch sondern indirekt toxisch über die ADCC wirken sollten, war daran zu denken, ebenfalls Effektorzellen hinzu zu fügen. Als Effektorzellen wurden zuvor isolierte PBMC's verwendet. Die Anzahl der Effektorzellen pro Well betrug dann 50000, was einem Verhältnis von Target- zu Effektorzellen von 1:10 entspricht. Im Ergebnisteil ist bei jedem Experiment angegeben, ob das Konstrukt direkt oder indirekt zytotoxisch wirken sollte.

Es wurden zusätzlich eine Minimum-Kontrolle (MIN), sowie eine Maximum-Kontrolle (MAX) durchgeführt. Bei der MIN-Kontrolle wurde kein zu überprüfendes Konstrukt hinzugefügt und somit nur die spontane Zelllyse bestimmt. Bei der MAX-Kontrolle wurde 0,5-prozentiges Triton-X hinzugefügt, um die maximal mögliche Zelllyse zu bestimmen (Bei Versuchsreihen mit PBMC's waren bei MIN und MAX auch jeweils PBMC's vorhanden).

Anschließend inkubierte die Platte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt in der Luft für eine bestimmte Zeit, je nach Analyse, im Brutschrank. Nun wurden jedem Well weitere 100 µl der frisch angesetzten Reaktionslösung hinzugefügt. Diese enthielt das Tetrazoliumsalz Iodotetrazoliumchlorid, das Enzym Diaphorase, NAD<sup>+</sup>, sowie Natriumlactat. Wie diese im speziellen angesetzt wurde, kann dem beigefügten Protokoll des Kit's entnommen werden. Nach zehnmütiger Inkubation wurden 50 µl der Stopplösung, welche Salzsäure enthält, hinzugefügt. Anschließend wurde die 96-Well-Platte in einem Wallac Victor<sup>2</sup>, 1420 Multilabel Counter der Firma Applied Biosystems (California, D) ausgewertet. Die Wellenlänge bei der gemessen wurde betrug 490 nm. Aus den Daten der Extinktion der einzelnen Wells mit den Konstrukten und der Wells mit der MIN- und MAX-Kontrolle, wurde dann die spezifische Lyse der Konstrukte berechnet.

Die spezifische Lyse ist gleich einem Quotienten. Der Zähler setzt sich aus der Subtraktion der Extinktion des Konstrukts von der Extinktion der MIN-Kontrolle zusammen. Der Nenner besteht aus der Subtraktion der Extinktion der MAX-Kontrolle von der Extinktion der MIN-Kontrolle. Multipliziert man den ganzen Bruch mit hundert erhält man die spezifische Lyse in Prozent.

### **3.2.12 Sequenzierung von DNA**

Um klonierte DNA oder mittels PCR amplifizierte DNA bezüglich der Basenabfolge zu überprüfen, wurden die Proben sequenziert. Dies wurde von der SEQ-IT GmbH & Co. KG in Kaiserslautern (D) durchgeführt.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1 BAR-Fab Konstrukte**

Ziel war zunächst die Herstellung dreier Fab-ähnlicher Konstrukte, bei denen die variablen Domänen der Schwereketten sowie der Leichtketten aus einer ARS2 Sequenz bestehen. Dabei sollte jedes der drei Konstrukte einen anderen Ausschnitt der ARS2 Sequenz besitzen. Das Epitop, welches den B-Zell

Rezeptor bindet, wird durch die Aminosäuren 343-375 repräsentiert und ist in allen drei Konstrukten enthalten [20].

Name	ARS2 Sequenz
ARS2 Fab 343-466	343-466
ARS2 Fab 290-410	290-410
ARS2 Fab 260-375	260-375

**Tabelle 11: BAR-Fab Konstrukte**

Links ist der Name des BAR-Fab Konstrukts angegeben, rechts die entsprechenden Aminosäuren der ARS2 Sequenz.

## Vorgehensweise

In einem ersten Schritt wurde die jeweils benötigte Sequenz für jedes der drei Konstrukte, einmal für die Schwereketten und einmal für die Leichtketten, mittels PCR von dem ARS2 pSfi FLAG Vektor amplifiziert und mit zwei flankierenden Schnittstellen versehen. Im Anschluss wurden die PCR Produkte dann in den TA-Vektor kloniert und in Bakterien transformiert. Nach Kultur und DNA-Isolation wurde dann zunächst die jeweilige ARS2 Sequenz an die Stelle der variablen Schwereketten-Domäne im pCES-1 Vektor mit Hilfe der Enzyme NcoI und BstE2 kloniert. Danach wurde dieselbe Sequenz jeweils an die variable Leichtketten-Domäne im pCES-1 Vektor mit Hilfe der Enzyme ApaL1 und XhoI kloniert. Nach Induktion und anschließender Proteinisolation wurden die Konstrukte mittels Western Blot nachgewiesen. Nun wurden die Konstrukte schließlich auf der U2932 Zelllinie auf Bindung getestet. Im nachfolgenden sind die Experimente im Detail dargestellt.

### 4.1.1 PCR zur Amplifikation der spezifischen Schnittstellen

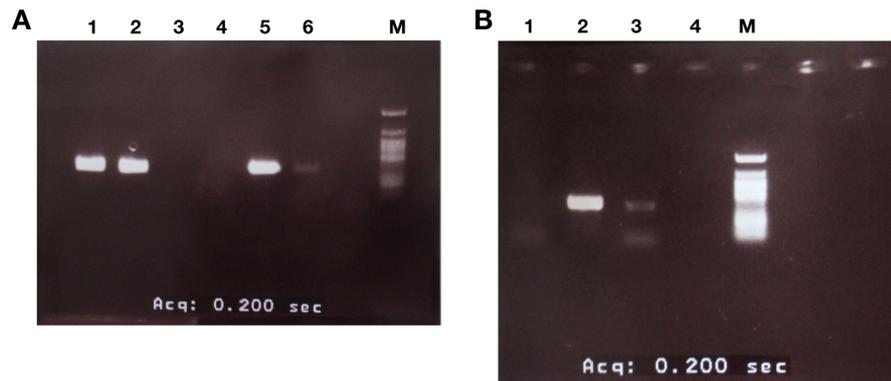
Name	ARS2 Sequenz	Sense Primer	Antisense Primer
VL 343-466 (1)	AA 343-466	ARS2 AA343 ApaL1-s	ARS2 AA466 Xho1-as
VL 290-410 (2)	AA 290-410	ARS2 AA290 ApaL1-s	ARS2 AA410 Xho1-as
VL 260-375 (3)	AA 260-375	ARS2 AA260 ApaL1-s	ARS2 AA375 Xho1-as
VH 343-466 (4)	AA 343-466	ARS2 AA343 Nco1-s	ARS2 AA466 BstE2-as
VH 290-410 (5)	AA 290-410	ARS2 AA290 Nco1-s	ARS2 AA410 BstE2-as
VH 260-375 (6)	AA 260-375	ARS2 AA260 Nco1-s	ARS2 AA375 BstE2-as

**Tabelle 12: PCR zur Amplifikation der spezifischen Schnittstellen für die Fab-Klonierung**

Es sind die jeweils zueinander passenden ARS2 Sequenzen und Primer angegeben.

Zunächst wurde, wie in 3.2.1.1 beschrieben, eine PCR durchgeführt, um spezifische flankierende Schnittstellen an beiden Enden der drei ARS2 Sequenzen anzufügen. Als Template diente der ARS2 pSfi FLAG Vektor. Es wurden insgesamt sechs Reaktionen mit jeweils einem individuellen Primerpaar durchgeführt:

Anschließend wurden jeweils zehn µl der sechs PCR Produkte auf einem einprozentigem Agarose Gel zusammen mit dem 50 bp Längenmarker aufgetragen und aufgetrennt (siehe 3.2.2).



**Abbildung 22: Agarosegel der PCR zur ARS2 Amplifikation**

**A:** Rechts ist der 50 bp Längenmarker zu sehen (M). In Spur eins, zwei, fünf und sechs sind Banden auf Höhe von ca. 400 bp sichtbar. In den Spuren drei und vier sind keine Banden zu erkennen. Die Laufspuren entsprachen den Nummern der PCR-Produkte.

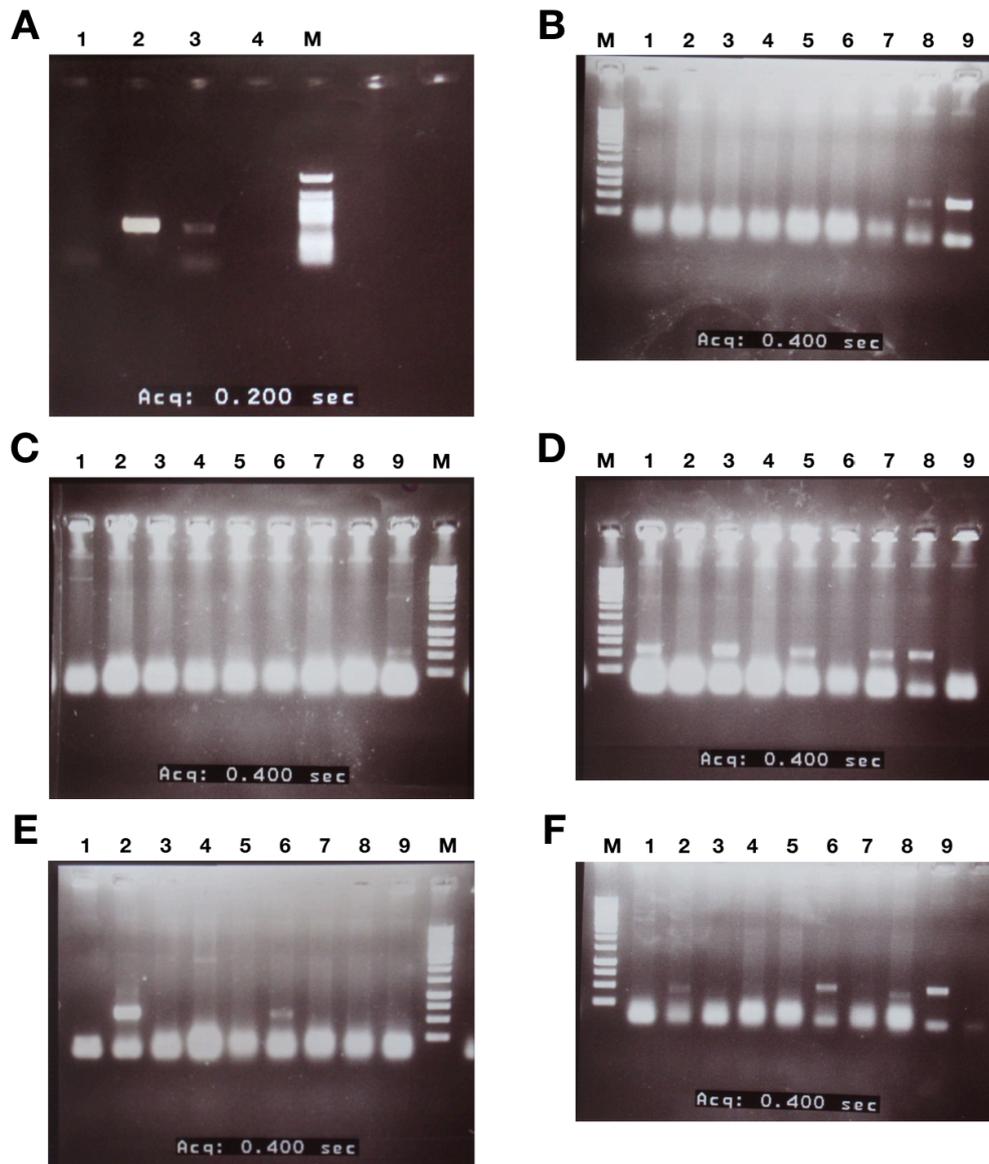
**B:** Rechts ist der 50 bp Längenmarker aufgetragen (M). In der Laufbahn der Proben zwei und drei ist jeweils eine Bande, circa in Höhe der 400 bp Bande, sichtbar. Probe zwei entsprach PCR vier, Probe drei entsprach PCR sechs. Die Bande der Laufbahn eins, die sich ebenfalls auf Höhe von 400 bp befindet, ist auf dem Foto nicht zu erkennen (war jedoch mit bloßem Auge zu erkennen). Sie entsprach der PCR drei.

Die Gelelektrophoresen ließen darauf schließen, dass jede der sechs PCRs in mindestens einem Fall zum Ergebnis eine erfolgreich amplifizierte Schnittstelle hervorgebracht hat.

## 4.1.2 Klonierung der BAR-Fab Konstrukte

### 4.1.2.1 TA-Klonierung der PCR Produkte

Als nächstes wurden die erfolgreich synthetisierten PCR Produkte aus 4.1.1 jeweils in den TA Vektor, wie in 3.2.7.1 beschrieben, kloniert. Im Anschluss wurden die TA Vektoren dann in DH 5 alpha Bakterien ohne Zwischenkultur transformiert und dann jeweils auf LB-Ampicilin-Agar ausgestrichen. Zum Nachweis der erfolgreichen Klonierung wurde dann von jeweils neun Kolonien der sechs Agarplatten eine Kolonien PCR mit den Primern M13 forward sowie M13 reverse gefahren. Die Primer binden hierbei nahe des 5'- bzw. 3'-Endes des Inserts. Die PCR Produkte wurden dann anschließend auf einem einprozentigem Agarose Gel aufgetragen und zusammen mit dem 1 kbp Längenmarker aufgetrennt.



**Abbildung 23: Agarosegel der Kolonien PCR zur Überprüfung der ARS2 TA Klonierung**

**A: VL 343-466 (1)** Rechts ist der 1 kbp Längenmarker zu erkennen (M). In der Laufbahn der dritten Probe (3) ist ca. auf Höhe von 600 bp eine Bande zu erkennen.

**B: VL 290-410 (2)** Links ist der 1 kbp Längenmarker aufgetragen (M). In den Laufbahnen der Proben acht und neun ist jeweils ca. auf Höhe von 600 bp eine Bande zu erkennen.

**C: VL 260-375 (3)** Rechts ist der 1 kbp Längenmarker zu erkennen (M). In der Laufbahn von Probe neun ist bei ca. 600 bp eine Bande zu erkennen.

**D: VH 343-466 (4)** Links ist der 1 kbp Längenmarker zu erkennen (M). In den Laufspuren der Proben eins, drei, fünf, sieben und acht ist bei ca. 600 bp eine Bande zu erkennen.

**E: VH 290-410 (5)** Rechts ist der 1 kbp Längenmarker zu erkennen (M). In den Laufbahnen der Proben zwei und sechs ist bei ca. 600 bp eine Bande zu erkennen.

**F: VH 260-375 (6)** Links ist der 1 kbp Längenmarker zu erkennen (M). In den Laufbahnen der Proben sechs und neun ist bei ca. 600 bp eine Bande zu erkennen.

Auf jeder Platte brachte jeweils mindestens eine Kolonie eine 600 bp Bande hervor. Damit ließ sich zeigen, dass es jeweils mindestens einen Klon mit jedem der sechs zuvor transformierten Plasmide gab. Von jeder Agarplatte wurde dann ein Klon in vier ml LB-Ampicilin-Medium angeimpft. Nachdem die

Flüssigkulturen gewachsen waren, wurde die DNA mittels Minipräparation aus den Bakterien isoliert. Die isolierte DNA wurde dann jeweils mit dem Primer M13 forward sequenziert. Die Sequenzierung konnte die Richtigkeit der Klone bestätigen.

TA Klone:

Name	ARS2 Sequenz
TA VL 343-466 (1)	AA 343-466
TA VL 290-410 (2)	AA 290-410
TA VL 260-375 (3)	AA 260-375
TA VH 343-466 (4)	AA 343-466
TA VH 290-410 (5)	AA 290-410
TA VH 260-375 (6)	AA 260-375

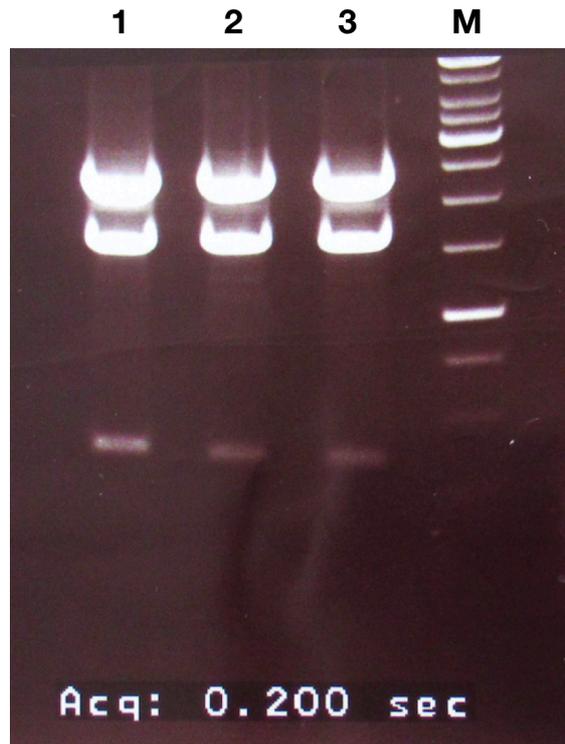
**Tabelle 13: Leichtketten-Klone der Fab-Konstrukte**

Links ist der Name des Klons und rechts die dazu passende ARS2 Sequenz angegeben.

#### 4.1.2.2 Klonierung der Schwereketten

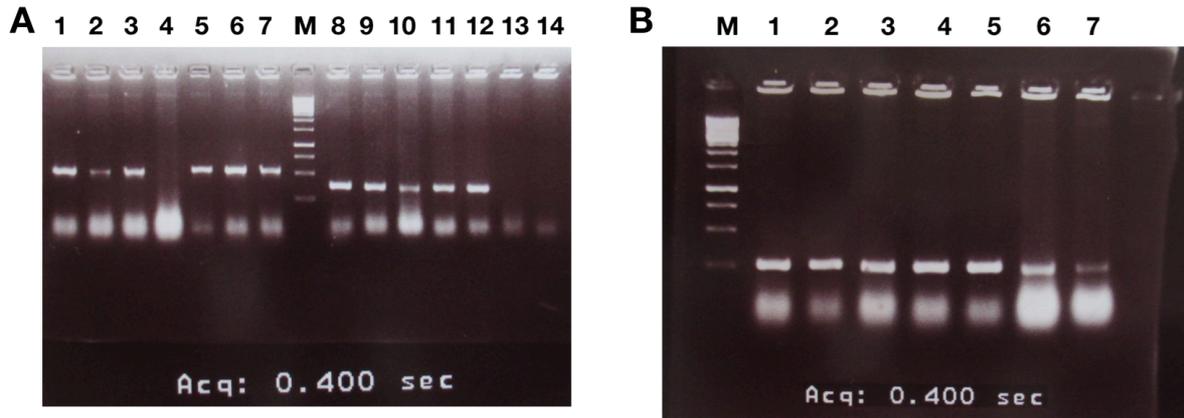
Um die Schwereketten zu klonieren wurden die drei verschiedenen ARS2 Sequenzen, die bereits als Bestandteil des TA Vektors vorlagen, in den pCES Vektor, an die für die variable Region der Schwereketten vorgesehene Stelle mit Hilfe der Restriktionsenzyme Nco1 und BstE2 kloniert. Die drei TA-Klone die zur Klonierung dienten waren: TA VH 343-466 (4), TA VH 290-410 (5) und TA VH 260-375 (6).

Als Zielvektor diente der pCES-1 Vektor. Die Inserts wurden aus den drei zuvor genannten TA Klonen geschnitten. Zunächst wurden zwei µg aller vier Vektoren mit Nco1 und BstE2 unter Zuhilfenahme des Buffer Red verdaut. Bei den Enzymen handelt es sich um solche, welche sticky ends produzieren. Die drei Inserts wurden über ein einprozentiges Agarose Gel zusammen mit dem 1 kbp Längenmarker aufgetrennt. Der Zielvektor pCES-1 wurde mir freundlicherweise, bereits mit den Enzymen Nco1 und BstE2 verdaut, vom José-Carreras-Zentrum in Homburg zur Verfügung gestellt.



**Abbildung 24: Agarosegel der geschnittenen TA Vektoren zur Klonierung der Schwereketten des BAR-Fab Konstruktes**  
 Rechts ist der 1 kbp Marker aufgetragen (M). Die unterste Bande ist auf dem Foto kaum bis überhaupt nicht auszumachen.  
 Bei den Proben eins, zwei und drei handelt es sich jeweils um den, mit NcoI und BstE2 geschnittenen, TA Vektor TA VH 343-466 (4), TA VH 290-410 (5) und TA VH 260-375 (6). Die unterste Bande, die sich jeweils bei ca 350 bp befindet, wurde dann jeweils ausgeschnitten.

Nachdem Insert- und Vektor-DNA isoliert worden sind, wurden Beide miteinander ligiert. Im Anschluss wurden die Ligationsansätze jeweils in TG 1 Bakterien mit Zwischenkultur transformiert und auf 2xTY-AG Agar ausgestrichen. Anschließend wurde von den auf den drei Agarplatten gewachsenen Kolonien eine Kolonien-PCR mit den Primern ARS2 AA343 NcoI-s und CH1-3' durchgeführt. Diese binden links beziehungsweise rechts des klonierten Inserts. Die PCR Produkte wurden auf einem zweiprozentigem Agarose Gel zusammen mit dem 1 kbp Längenmarker aufgetrennt.



**Abbildung 25: Agarosegel der Kolonien PCR zur Überprüfung der Schwerketten pCES Klonierung des BAR-Fab Konstruktes ARS2 Fab 343-466, ARS2 Fab 290-410 und ARS2 Fab 260-375**

**A: ARS2 Fab 343-466 und ARS2 Fab 290-410** In der Mitte des Gels ist der 1 kbp Längenmarker aufgetragen (M). Auf den Slots eins bis sieben waren der Reihe nach Kolonien der Agarplatte der Ligation TA 343-466 (4) + pCES aufgetragen. Zu erkennen ist, dass die Laufspuren eins bis drei sowie fünf bis sieben jeweils eine Bande auf Höhe von ca. 600 bp hervorgebracht haben. In den Slots acht bis 14 waren die Kolonien der Agarplatte der Ligation TA 290-410 (5) + pCES aufgetragen. Man sieht, dass die Laufspuren acht bis zwölf jeweils eine Bande in Höhe von ca. 400 bp hervorgebracht haben.  
**B: ARS2 Fab 260-375** Links ist der 1 kbp Längenmarker aufgetragen (M). In den Slots eins bis sieben sind die Kolonien der Agarplatte der Ligation TA 260-375 + pCES aufgetragen. Zu erkennen ist, dass alle sieben Kolonien jeweils eine Bande in Höhe von ca. 250 bp hervorgebracht haben.

Aus den Fotos war abzuleiten, dass auf jeder Agarplatte mindestens eine Kolonie eine Bande hervorgebracht hatte. Die unterschiedlichen Lauflängen der Banden ergaben sich aus der Tatsache heraus, dass ein ARS2-Primer als Sense-Primer benutzt worden war und die drei verschiedenen Vektoren drei verschiedene Abschnitte der kompletten ARS2 Sequenz besitzen und somit der Primer an drei unterschiedlichen Positionen gebunden hatte.

Jeweils eine der Kolonien auf den drei verschiedenen Agarplatten, die eine Bande hervorgebracht hatten, wurde dann in vier ml 2xTY-AG-Medium angeimpft. Nachdem die Kulturen gewachsen waren, wurde die DNA mittels Minipräparation aus den Bakterien isoliert. Nun befanden sich die drei verschiedenen ARS2 Sequenzen jeweils an der, für die variable Schwerkettendomäne vorgesehenen, Stelle im pCES-1 Vektor:

Name	ARS2 Sequenz
pCES VH 343-466 (4)	AA 343-466
pCES VH 290-410 (5)	AA 290-410
pCES VH 260-375 (6)	AA 260-375

**Tabelle 14: Schwerketten-Klone der Fab-Klonierung**

Links ist der Name und rechts die dazu passende ARS2 Sequenz angegeben.

### 4.1.2.3 Klonierung der Leichtkette

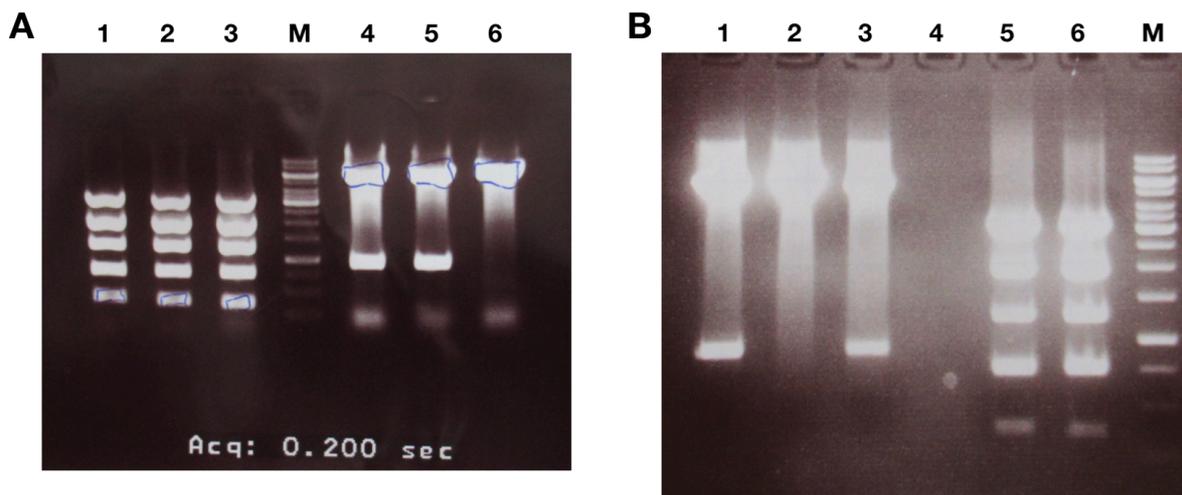
Um die Leichtkette zu klonieren, wurden nun die in den TA Vektoren befindlichen ARS2 Sequenzen in die pCES-1 Vektoren, mit den vorher schon klonierten Schwerketten, mit Hilfe der Enzyme ApaL1 und Xho1, an die im Vektor vorgesehene Stelle für die variable Domäne der Leichtkette gebracht. Als Zielvektoren dienten folglich die pCES-1 Vektoren aus dem vorherigen Schritt:

pCES VH343-466 (4), pCES VH 290-410 (5) und pCES VH 260-375 (6).

Als Ursprung der Inserts wurden folgende TA Vektoren verwendet:

TA VL 343-466 (1), TA VL 290-410 (2) und TA VL 260-375 (3) (siehe 4.1.2.1).

In einem ersten Schritt wurden jeweils zwei  $\mu\text{g}$  aller sechs Vektoren (Insert-Vektoren sowie Zielvektoren) mit den Enzymen ApaL1 und Xho1 unter Zuhilfenahme des Buffer Red verdaut. Bei den Enzymen handelt es sich um Restriktionsendonukleasen die sticky ends machen. Die drei TA Vektoren Inserts wurden anschließend mit einem zweiprozentigem Agarosegel zusammen mit einem 1 kbp Längenmarker aufgetrennt.



**Abbildung 26: Agarosegel der geschnittenen TA Vektoren TA VL 343-466 (1), TA VL 290-410 (2) und TA VL 260-375 (3)**

**A:** TA VL 343-466 (1) Zu sehen ist in der Mitte der 1 kbp Längenmarker (M). In Slot eins wurde der geschnittene TA Vektor TA VL 343-466 (1) aufgetragen. Die unterste Bande, die sich ca. auf Höhe von 350 bp befand, wurde im Anschluss ausgeschnitten.

**B:** TA VL 290-410 (2) und TA VL 260-375 (3) Am rechten Rand ist der 1 kbp Längenmarker aufgetragen (M). In Spur fünf wurde TA VL 290-410 (2), in Spur sechs TA VL 260-375 (3) aufgetragen. Die unterste Bande, die sich ca. auf Höhe von 350 bp befindet, wurde jeweils ausgeschnitten.

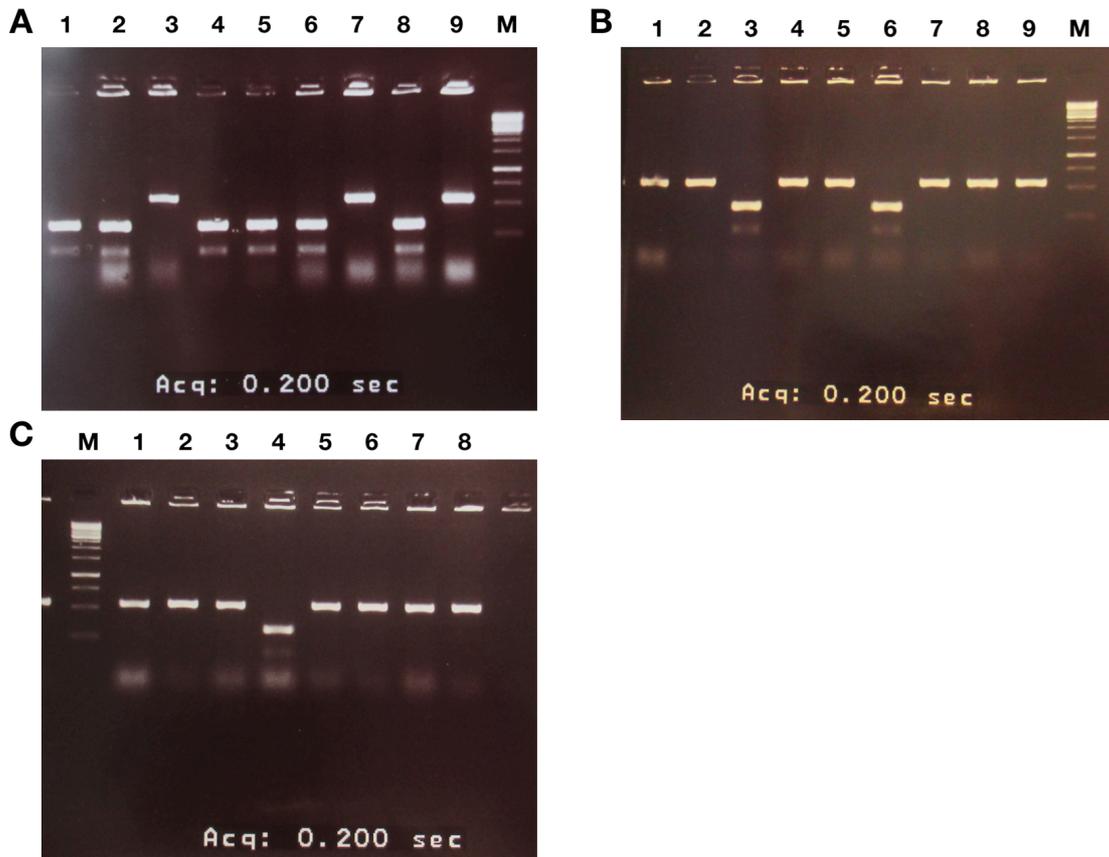
Bei der untersten Bande handelte es sich jeweils um das Insert. Nachdem alle drei Inserts ausgeschnitten waren, die DNA isoliert worden war, und währenddessen die drei geschnittenen pCES Vektoren mit Hilfe der FastAP vorbereitet wurden, konnte mit der Ligation fortgefahren werden. Ligiert wurde jeweils paarweise:

Ligation	Vektor-DNA	Insert-DNA
4+1	pCES VH 343-466 (4) ApaL1/Xho1	TA VL 343-466 (1) ApaL1/Xho1
5+2	pCES VH 290-410 (5) ApaL1/Xho1	TA VL 343-466 (2) ApaL1/Xho1
6+3	pCES VH 260-375 (6) ApaL1/Xho1	TA VL 343-466 (3) ApaL1/Xho1

**Tabelle 15: Ligation des pCES Vektors für die Fab-Konstrukte**

Es sind die zueinander passende Vektor-DNA und Insert-DNA gegenübergestellt.

Nach der Ligation wurde jeweils in TG 1 Bakterien mit Zwischenkultur transformiert und anschließend auf 2xTY-AG-Agar ausplattiert. Nachdem auf allen drei Agarplatten Kolonien gewachsen waren, wurde eine Kolonien PCR mit den zwei Primern M13 reverse und kappa-as durchgeführt. Die PCR Produkte wurden anschließend zusammen mit dem 1 kbp Längenmarker auf einem zweiprozentigem Agarosegel aufgetragen.



**Abbildung 27: Agarosegel der Kolonien PCR zur Überprüfung der Leichtketten pCES Klonierung der BAR-Fab Konstrukte ARS2 Fab 343-466 (Ligation 4+1), ARS2 Fab 290-410 (Ligation 5+2) und ARS2 Fab 260-374 (Ligation 6+3)**

**A: ARS2 Fab 343-466 (Ligation 4+1)** Am rechten Rand ist der 1 kbp Längenmarker aufgetragen (M). In den Laufspuren der Proben drei, sieben und neun ist jeweils bei ca. 600 bp eine Bande zu erkennen. Bei den Laufspuren der Proben eins, zwei, vier, fünf, sechs und acht ist jeweils bei ca. 300 bp eine Bande zu erkennen. Angeimpft wurden später die Klone mit der 600 bp Bande.

**B: ARS2 Fab 290-410 (Ligation 5+2)** Rechts ist der 1 kbp Längenmarker aufgetragen (M). In den Laufspuren der Proben eins, zwei, vier, fünf, sieben, acht und neun ist bei ca. 600 bp jeweils eine Bande zu erkennen. In den Laufspuren der Proben drei und sechs ist bei ca. 300 bp eine Bande zu sehen. Später wurden die Klone mit der 600 bp Bande angeimpft.

**C: ARS2 Fab 260-374 (Ligation 6+3)** Linkst ist der 1 kbp Längenmarker aufgetragen (M). In den Laufspuren der Proben eins, zwei, drei, fünf, sechs, sieben und acht ist jeweils eine 600 bp Bande zu erkennen. In der Laufspur der Probe vier ist eine 300 bp Bande zu sehen. Angeimpft wurden die Klone mit der 600 bp Bande.

Jeweils drei Kolonien von jeder der drei verschiedenen Ligationen wurden dann in jeweils vier ml 2xTY-AG-Medium angeimpft, nachdem sie mittels Kolonien-PCR als erfolgreich transformiert bestätigt werden konnten. Anschließend wurde die DNA mittels Minipräparation isoliert. Die DNA wurde dann mit Hilfe der Primer M13 reverse und CH1-3' sequenziert. Die Sequenzierung bestätigte die erfolgreiche Klonierung der drei unterschiedlichen Expressionsklone.

<b>Fertig klonierte pCES Vektoren der 3 Konstrukte</b>
pCES VHVL 343-466 1
pCES VHVL 343-466 2
pCES VHVL 343-466 3
pCES VHVL 290-410 1
pCES VHVL 290-410 2
pCES VHVL 290-410 3
pCES VHVL 260-375 1
pCES VHVL 260-375 2
pCES VHVL 260-375 3

**Tabelle 16: Fertig klonierte pCES-Vektoren der Fab Konstrukte**

## **4.1.3 Expression der BAR-Fab Konstrukte**

### **4.1.3.1 Induktion und Proteinisolation**

<b>Konstrukt</b>
ARS2 Fab 343-466 1
ARS2 Fab 343-466 2
ARS2 Fab 343-466 3
ARS2 Fab 290-410 1
ARS2 Fab 290-410 2
ARS2 Fab 290-410 3
ARS2 Fab 260-375 1
ARS2 Fab 260-375 2
ARS2 Fab 260-375 3

**Tabelle 17: Fab-Konstrukte**

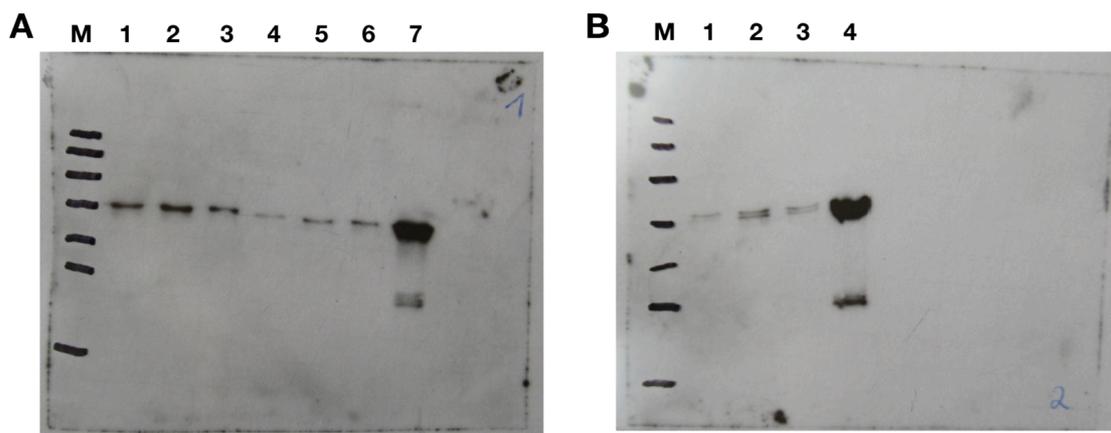
Zur Induktion wurden die Flüssigkulturen mit den fertig klonierten pCES Vektoren verwendet (siehe 4.1.2.3). Es wurde dann mit IPTG induziert. Im Anschluss wurde das nun produzierte Konstrukt über

den enthaltenen Histidin-Tag mit Hilfe der TALON beads isoliert. Die Proteinmenge wurde dann photometrisch bestimmt.

#### 4.1.3.2 Western Blot und Immunfärbung

Die insgesamt neun Konstrukte wurden nun mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese zusammen mit dem PageRuler™ Prestained Protein Ladder aufgetrennt und im Anschluss mittels Western Blot auf eine PVDF Membran gebロットet. Die Membran wurde dann einer Immunfärbung unterzogen. Als primärer Antikörper wurde, aufgrund des His-Tags der Konstrukte, der Penta-His Antibody, BSA-free, mouse monoclonal IgG1 von Qiagen (Hilden, Germany) verwendet. Anschließend wurde die Membran auf einem Hyperfilm abgebildet. Es wurden zwei Gele gefahren. Gel 1 wurde mit den Konstrukten ARS2 Fab 343-466 1-3 und ARS2 Fab 290-410 1-3 beladen. Gel 2 wurde mit den Konstrukten ARS2 Fab 260-375 1-3 beladen.

Als positiv Kontrolle wurde auf jedem der beiden Gele ein bispezifisches ARS2-CD3 Konstrukt verwendet (laborinterne Kontrolle).



**Abbildung 28:** Hyperfilm der Western Blot Analyse der BAR-Fab Konstrukte ARS2 Fab 343-466 1 bis 3, ARS2 Fab 290-410 1 bis 3 und ARS2 Fab 260-375 1 bis 3

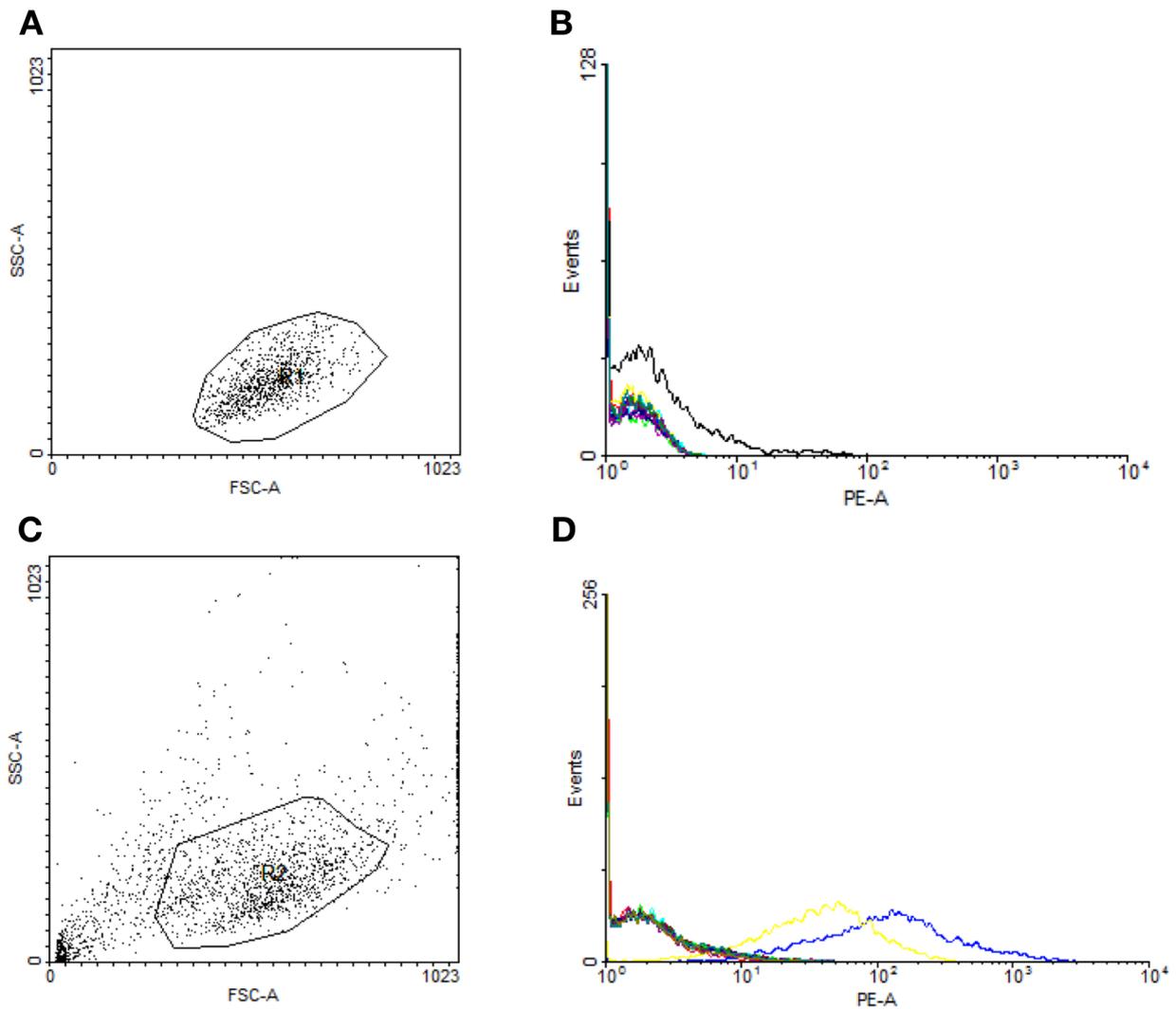
**A:** ARS2 Fab 343-466 1 bis 3 und ARS2 Fab 290-410 1 bis 3 Links ist der SDS Längenmarker mit einem Stift dargestellt worden (M). Die 180 kDa und die 130 kDa Bande sind nicht zu sehen. Die erste Bande von oben ist somit die 100 kDa Bande. Bei den Proben eins bis sechs handelt es sich der Reihe nach um die BAR-Fab Konstrukte ARS2 Fab 343-466 1-3 und ARS2 Fab 290-410 1-3. Als siebte Probe ist die Positiv Kontrolle zu sehen. Alle Konstrukte sowie auch die Positiv Kontrolle laufen etwas oberhalb der 40 kDa Bande.

**B:** ARS2 Fab 260-375 1 bis 3 Links ist der SDS Längenmarker mit einem Stift markiert worden (M). Die 180 kDa und die 130 kDa Bande sind nicht zu sehen. Die erste Bande von oben ist somit die 100 kDa Bande. Bei den drei Proben eins bis drei handelt es sich jeweils der Reihe nach um die Konstrukte ARS2 Fab 260-375 1 bis 3. In Laufspur vier ist die Positiv Kontrolle aufgetragen. Alle drei Konstrukte sowie auch die Positiv Kontrolle laufen etwas oberhalb der 40 kDa Bande des Markers.

Die anschließende Auswertung der Blots brachte den Beweis für die erfolgreiche Proteinexpression aller BAR-Fab Klone. Die Übereinstimmung zwischen erwarteter Größe (auf Grund der Sequenzlänge) und tatsächlicher Größe (auf Grund der Lauflänge im Western Blot) ließ diesen Schluss zu. Das Vorliegen der Proteine bestätigt damit auch die zuvor erfolgreich erfolgte Induktion sowie Proteinisolation.

#### **4.1.4 Oberflächenfärbung zur Kontrolle der Bindung**

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Konstrukte erfolgreich produziert wurden, wurde nun eine Oberflächenfärbung durchgeführt, um zu erörtern, ob die Konstrukte auch spezifisch auf den Tumorzellen binden. Dazu wurden zwei Zelllinien verwendet. Zum einen die HBL-1 Zelllinie als ARS2 negative Zelllinie und zum anderen die U2932 Zelllinie als ARS2 positive Zelllinie. Alle neun Konstrukte wurden auf beiden Zelllinien mittels Durchflusszytometrie getestet, nachdem die Zellen mit den Konstrukten inkubiert und einer Immunfärbung unterzogen worden waren. Zusätzlich wurde eine positiv Kontrolle ARS2-CD3 sowie eine negativ Kontrolle LRPAP-CD3 getestet (laborinterne Kontrollen). Aufgrund des His-Tags der Konstrukte wurde der Penta-His Antibody, BSA-free, mouse monoclonal IgG1 von Qiagen (Hilden, Germany) als primärer Antikörper verwendet. Des Weiteren wurden der sekundäre Antikörper Anti-mouse Biotin AK sowie Streptavidin RPE als Farbstoff verwendet. Die Inkubationszeit der Konstrukte betrug 20 Minuten, die Inkubationstemperatur war Raumtemperatur.



**Abbildung 29: Dotplot und Histogramm der Oberflächenfärbung der HBL-1 Zelllinie, sowie der U2932 Zelllinie nach Inkubation mit den BAR-Fab Konstrukten ARS2 Fab 343-466 1-3, ARS2 Fab 290-410 1-3 und ARS2 Fab 260-375 1-3**

**A: Dotplot HBL-1 Zelllinie** Dotplot der Analyse der HBL-1 Zelllinie. Auf der Abszisse ist der forward scatter (FSC-A), auf der Ordinate der sideward scatter (SSC-A), aufgetragen. Es wurde ein Gate R1 angelegt.

**B: Histogramm HBL-1 Zelllinie** Histogramm der Analyse der HBL-1 Zelllinie. Auf der Abszisse ist die Emission des Phycoerythrin Farbstoffes (PE-A) aufgetragen. Auf der Ordinate sind die Events aufgetragen. Die schwarze Kurve spiegelt den Leerwert wider. Die blaue Kurve zeigt die positiv Kontrolle ARS2 CD3. Die negativ Kontrolle LRPAP CD3 wird durch die rote Kurve repräsentiert. Die restlichen, schwer voneinander abzugrenzenden Kurven zeigen die restlichen BAR-Fab Konstrukte.

**C: Dotplot U2932 Zelllinie** Dotplot der Analyse der U2932 Zelllinie. Auf der Abszisse ist der forward scatter (FSC-A), auf der Ordinate der sideward scatter (SSC-A) aufgetragen. Es wurde ein Gate R2 angelegt.

**D: Histogramm U2932 Zelllinie** Histogramm der Analysen der U2932 Zelllinie. Auf der Abszisse ist die Emission des Phycoerythrin Farbstoffes (PE-A) aufgetragen. Auf der Ordinate sind die Events aufgetragen. Die schwarze Kurve spiegelt den Leerwert wider. Die blaue Kurve zeigt die Analyse der positiv Kontrolle ARS2 CD3. Die rote Kurve zeigt die negativ Kontrolle LRPAP CD3. Die gelbe Kurve zeigt die Analyse von ARS2 Fab 343-466 3. Die restlichen, schwer zu unterscheidenden Kurven stellen die Analysen der restlichen BAR-Fab Konstrukte dar.

Die Experimente zeigten, dass weder eines der Konstrukte noch die Positiv Kontrolle auf der HBL-1 Zelllinie gebunden haben. Auf der U2932 Zelllinie hingegen hat sowohl die Positiv Kontrolle als auch das BAR-Fab Konstrukt ARS2 Fab 343-466 3 gebunden. Aus den Ergebnissen beider Zelllinien zusammen ließ sich der Schluss ziehen, dass das BAR-Fab Konstrukt mit der ARS2 Sequenz AA 343-466 spezifisch an den B-Zell Rezeptor der ARS2 positiven U2932 Zelllinie bindet. Bei ARS2 negativen Zelllinien kommt es hingegen zu keiner Bindung. Die Tatsache, dass trotz der genetischen Übereinstimmung der Konstrukte ARS2 Fab 343-466 1 bis 3 nur eines der drei gebunden hat, könnte womöglich mit Faltungsprozessen zu tun haben, die nach der Transkription und Translation stattgefunden haben.

## 4.2 BAR-Fab-ETA Konstrukt

Nachdem nun gezeigt werden konnte, dass eines der BAR-Fab Konstrukte auf Tumorzellen spezifisch bindet, war nun die Idee, dieses eine Konstrukt so zu modifizieren, dass es zytotoxisch wirken kann. Der Ausgangspunkt war somit das aus der vorherigen Analyse bekannte BAR-Fab Konstrukt ARS2 Fab 343-466 3. Die Zytotoxizität sollte durch das ETA Toxin beziehungsweise das ETA-KDEL Toxin zu Stande kommen. Beide Toxine haben mir bereits als Teil des pCES-1 Vektors vorgelegen.

### Vorgehensweise

Das Prinzip war, die Sequenz für das bereits klonierte BAR-Fab Konstrukt als Ganzes mittels Hind3 und BstE2 aus dem bereits klonierten Vektor auszuschneiden, und dann in den pCES-1 Vektor mit enthaltenem Toxin zu klonieren. Anschließend sollte erneut auf Bindung getestet und dann mittels LDH Zytotoxizitätsassay die Zytotoxizität überprüft werden.

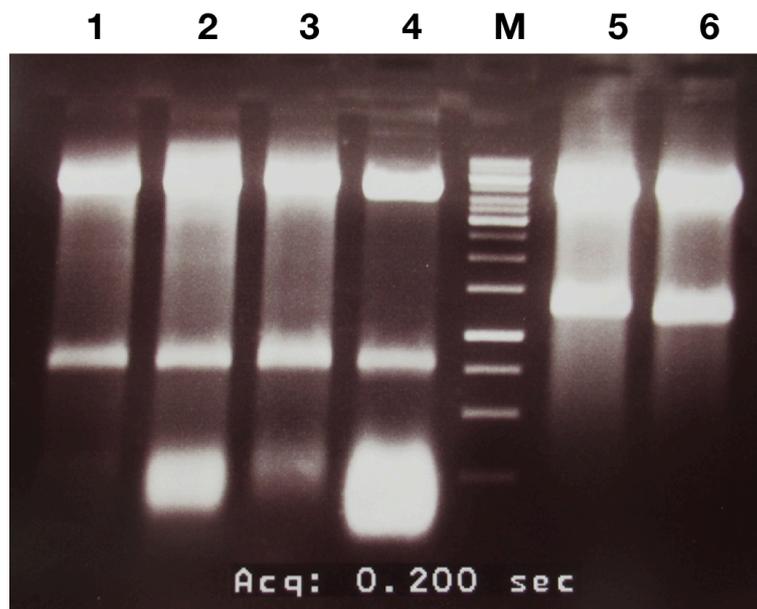
### 4.2.1 Klonierung der BAR-Fab-ETA Konstrukte

Um das Fab-ETA beziehungsweise das Fab-ETA(KDEL) Konstrukt zu klonieren, wurden die zwei pCES-1 Vektoren mit den am 3'-Ende der Not1 Schnittstelle befindlichen ETA und ETA-KDEL Toxinen verwendet. Diese dienten bei der Klonierung als Zielvektoren. Das Insert wurde aus dem pCES-1 Vektor des Fab Konstruktes, welches zuvor auf der U2932 Zelllinie gebunden hatte, gewonnen.

Insert-DNA	Vektor-DNA
pCES VHVL 343-466 3	pCES ETA
pCES VHVL 343-466 3	pCES ETA(KDEL)

**Tabelle 18: Vektor-DNA und Insert-DNA der BAR-Fab-ETA Konstrukte**  
Insert-DNA und Vektor-DNA sind zueinander passend gegenübergestellt.

Alle drei Vektoren wurden nun mit den Restriktionsenzymen Hind3 und BstE2, unter Zuhilfenahme des Buffer Red, verdaut. Da Hind3 vor der Signalsequenz für die variable Domäne der Leichtkette schneidet und BstE2 hinter der variablen Domäne der Schwereketten schneidet, wird die komplette - ARS2 enthaltene - Fab Sequenz als Insert ausgeschnitten. Es wurden jeweils zwei µg verdaut. Beides sind Enzyme, die sticky ends produzieren. Die Vektor-DNA sowie auch die Insert-DNA wurden zusammen mit einem 1 kbp Längenmarker über ein einprozentiges Agarosegel aufgetrennt, ausgeschnitten und dann aufgereinigt.



**Abbildung 30: Agarosegel der geschnittenen Vektoren pCES VHVL 343-466 3 und pCES ETA sowie pCES ETA-KDEL**

Mittig ist der 1 kbp Längenmarker zu erkennen (M). In den ersten zwei Slots wurde jeweils der geschnittene Vektor pCES ETA aufgetragen. In den Slots drei und vier wurde der geschnittene Vektor pCES ETA-KDEL aufgetragen. Zu erkennen ist bei allen Proben unter anderem eine Bande auf Höhe von ca. 3700 bp. Von jeweils einer Probe jedes Vektors wurde diese Bande ausgeschnitten. Rechts des Längenmarkers wurde in Slot fünf und sechs jeweils der Vektor pCES VHVL 343-466 3 aufgetragen. Ausgeschnitten wurde die Insert-DNA, die sich in den Banden, welche circa auf Höhe von 1250 bp laufen, befindet.

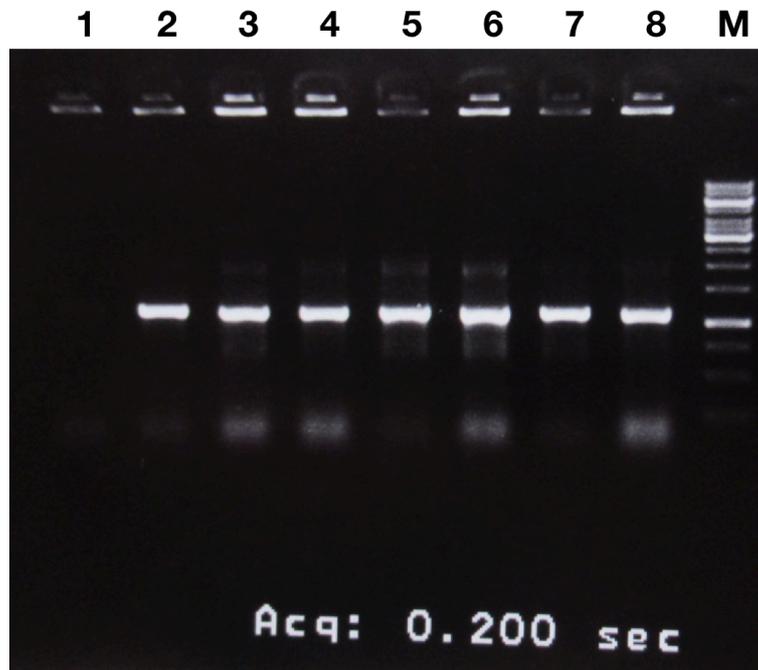
Zur Ligation wurden folgende Vektor-DNA und Insert-DNA Kombinationen verwendet:

Vektor-DNA	Insert-DNA
pCES ETA Hind3/BstE2	pCES VHVL 343-466 3 Hind3/BstE2
pCES ETA-KDEL Hind3/BstE2	pCES VHVL 343-466 3 Hind3/BstE2

**Tabelle 19: Ligation der BAR-Fab-ETA Konstrukte**

Zueinander passende Vektor-DNA und Insert-DNA sind einander gegenübergestellt.

Anschließend wurde in TG 1 Bakterien mit Zwischenkultur transformiert und auf 2xTY-AG-Agar ausplattiert. Von den Kolonien auf den zwei Platten wurde jeweils eine Kolonien PCR mit den Primern ARS2 AA 343 Nco1-s und 3'Anti-Sense KDEL Mut gemacht, die links und rechts der Inserts binden.



**Abbildung 31: Agarosegel der Kolonien PCR zur Überprüfung der ETA, beziehungsweise ETA-KDEL Klonierung**  
 Rechts ist der 1 kbp Längenmarker aufgetragen (M). In den ersten vier Slots wurde jeweils eine Kolonie der ETA Klonierung - Ligation: pCES ETA Hind3/BstE2 + pCES VHVL 343-466 3 Hind3/BstE2 - aufgetragen. Zu erkennen ist bei Probe zwei, drei und vier jeweils auf Höhe von circa 1200 bp eine Bande. In den Slots fünf bis acht wurde jeweils eine Kolonie der ETA-KDEL Klonierung - Ligation: pCES ETA-KDEL Hind3/BstE2 + pCES VHVL 343-466 3 Hind3/BstE2 - aufgetragen. Hier ist bei allen vier Proben jeweils eine Bande auf Höhe von circa 1200 bp zu erkennen.

Nun wurden insgesamt sechs Klone - drei ETA Klone und drei ETA-KDEL Klone - jeweils in vier ml 2xTY-AG-Medium angeimpft. Nachdem die DNA mittels Minipräparation aus den Bakterien isoliert worden war, wurde die DNA der sechs Klone mit dem Primer M13 rev sequenziert. Das Ergebnis der Sequenzierung ließ auf die erfolgreiche Klonierung der sechs Klone schließen.

Name der BAR-Fab ETA-KDEL pCES Klone
pCES ETA ARS2 343-466 1
pCES ETA ARS2 343-466 2
pCES ETA ARS2 343-466 3
pCES ETA-KDEL ARS2 343-466 1
pCES ETA-KDEL ARS2 343-466 2
pCES ETA-KDEL ARS2 343-466 3

**Tabelle 20: BAR-Fab ETA-KDEL pCES Klone**

## 4.2.2 Expression der BAR-Fab-ETA und -ETA-KDEL Konstrukte

### 4.2.2.1 Induktion und Proteinisolation

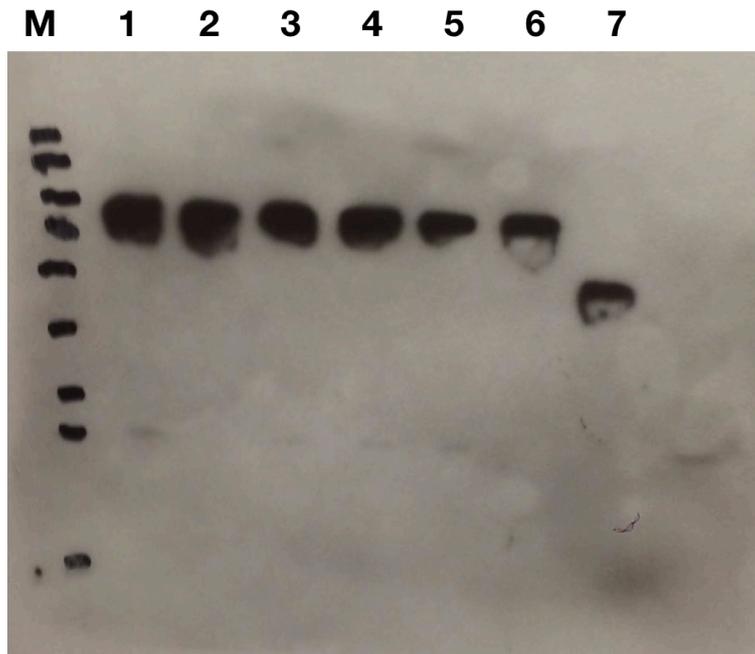
Die vorliegenden sechs Klone, drei ETA Klone und drei ETA-KDEL Klone, sollten nun exprimiert werden. Dazu wurden die Flüssigkulturen aus 4.2.1 verwendet und mit IPTG induziert. Im Anschluss wurden die Fab-ETA Konstrukte sowie die Fab-ETA-KDEL Konstrukte mit Hilfe der TALON beads und des His-Tags isoliert. Die Proteinmenge wurde dann photometrisch bestimmt.

Konstrukt
ARS2 Fab-ETA 343-466 1
ARS2 Fab-ETA 343-466 2
ARS2 Fab-ETA 343-466 3
ARS2 Fab-ETA-KDEL 343-466 1
ARS2 Fab-ETA-KDEL 343-466 2
ARS2 Fab-ETA-KDEL 343-466 3

Tabelle 21: BAR-Fab-ETA Konstrukte

### 3.2.2.2 Wester Blot und Immunfärbung

Die sechs isolierten Konstrukte wurden nun auf einem zwölfprozentigem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF Membran geblottet. Als positiv Kontrolle wurde ein bispezifisches Konstrukt, ARS2-CD3, verwendet (laborinterne Kontrolle). Im Anschluss wurde die Membran einer Immunfärbung unterzogen. Als primärer Antikörper wurde der Penta-His Antibody, BSA-free, mouse monoclonal IgG1 von Qiagen (Hilden, Germany) verwendet. Die Membran wurde auf einem Hyperfilm abgebildet.

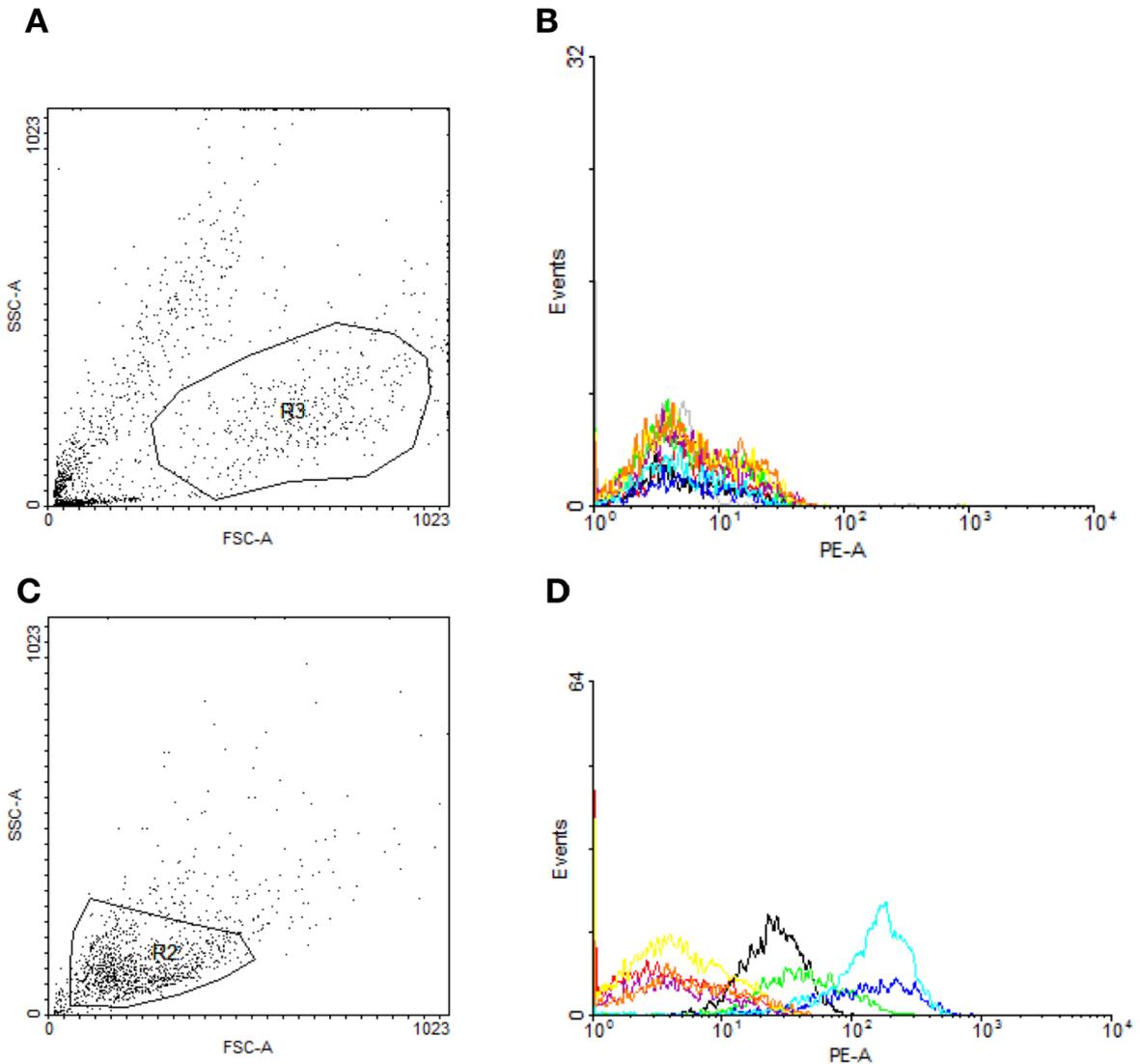


**Abbildung 32: Hyperfilm der Western Blot Analyse der BAR-Fab ETA Konstrukte ARS2 Fab-ETA 343-466 1 bis 3 und der BAR-Fab-ETA-KDEL Konstrukte ARS2 Fab-ETA-KDEL 343-466 1 bis 3**  
 Links ist der Längenmarker mit einem Stift markiert worden (M). Bei den sechs rechts des Längenmarkers aufgetragenen Proben handelt es sich der Reihe nach um die Konstrukte ARS2 Fab-ETA 343-466 1 bis 3 und ARS2 Fab-ETA-KDEL 343-466 1 bis 3. In der Laufspur sieben ist die Positiv Kontrolle zu erkennen (ARS2 CD3).

Dem Blot konnte entnommen werden, dass die Proteinexpression aller sechs Klone erfolgreich war. Dieser Schluss konnte durch die Übereinstimmung der zu erwarteten Größe (auf Grund der Sequenzlänge) und der tatsächlichen Größe (auf Grund der Lauflänge im Western Blot) gefasst werden. Demzufolge war auch die zuvor verlaufene Induktion sowie die Proteinisolation erfolgreich.

### 4.2.3 Oberflächenfärbung zur Kontrolle der Bindung

Die erfolgreich hergestellten sechs Konstrukte wurden nun ebenfalls auf Bindung auf der ARS2 positiven U2932 Zelllinie, sowie auf der ARS2 negativen HBL-1 Zelllinie überprüft. Ebenfalls wurde eine Positiv Kontrolle (ARS2-CD3), sowie eine Negativ Kontrolle (LRPAP-CD3), in Form von bispezifischen Konstrukten mit analysiert (laborinterne Kontrolle). Als primärer Antikörper wurde aufgrund des His-Tags der Penta-His Antibody, BSA-free, mouse monoclonal IgG1 von Qiagen (Hilden, Germany) verwendet. Des Weiteren wurden der Anti-mouse Biotin AK als sekundärer Antikörper, sowie Streptavidin RPE als Farbstoff, verwendet. Die Inkubationszeit der Konstrukte auf den Zellen betrug 20 Minuten. Es wurde bei Raumtemperatur inkubiert.



**Abbildung 33: Dotplot und Histogramm der Oberflächenfärbung der HBL-1 Zelllinie, sowie der U2932 Zelllinie, nach Inkubation mit den Konstrukten ARS2 Fab-ETA 343-466 1 bis 3 sowie ARS2 Fab-ETA-KDEL 343-466 1 bis 3**

**A: Dotplot HBL-1 Zelllinie** Auf der Abszisse ist der forward scatter (FSC-A) aufgetragen. Auf der Ordinate ist der sideward scatter (SSC-A) aufgetragen. Es wurde ein Gate R3 angelegt.

**B: Histogramm HBL-1 Zelllinie** Auf der Abszisse ist die Emission des Phycoerythrin Farbstoffes (PE-A) aufgetragen. Auf der Ordinate sind die Events aufgetragen. Die Kurven sind kaum voneinander abzugrenzen. Die rote Kurve zeigt die negativ Kontrolle LRPAP CD3. Die schwarze Kurve zeigt die positiv Kontrolle ARS2 CD3.

**C: Dotplot U2932 Zelllinie** Auf der Abszisse ist der forward scatter aufgetragen (FSC-A). Auf der Ordinate ist der sideward scatter aufgetragen (SSC-A). Es wurde eine Gate R2 angelegt.

**D: Histogramm U2932 Zelllinie** Auf der Abszisse ist die Emission des Phycoerythrin Farbstoffes (PE-A) aufgetragen. Auf der Ordinate sind die Events aufgetragen. Die schwarze Kurve zeigt die positiv Kontrolle ARS2 CD3. Die negativ Kontrolle LRPAP CD3 wird durch die rote Kurve repräsentiert. Die hellgrüne Kurve zeigt das Konstrukt ARS2 Fab ETA 343-466 1. Die hellblaue Kurve zeigt das Konstrukt ARS2 Fab ETA(KDEL) 343-466 1. Die dunkelblaue Kurve zeigt das Konstrukt ARS2 Fab ETA 343-466 2. Die restlichen Kurven spiegeln die restlichen Konstrukte wider.

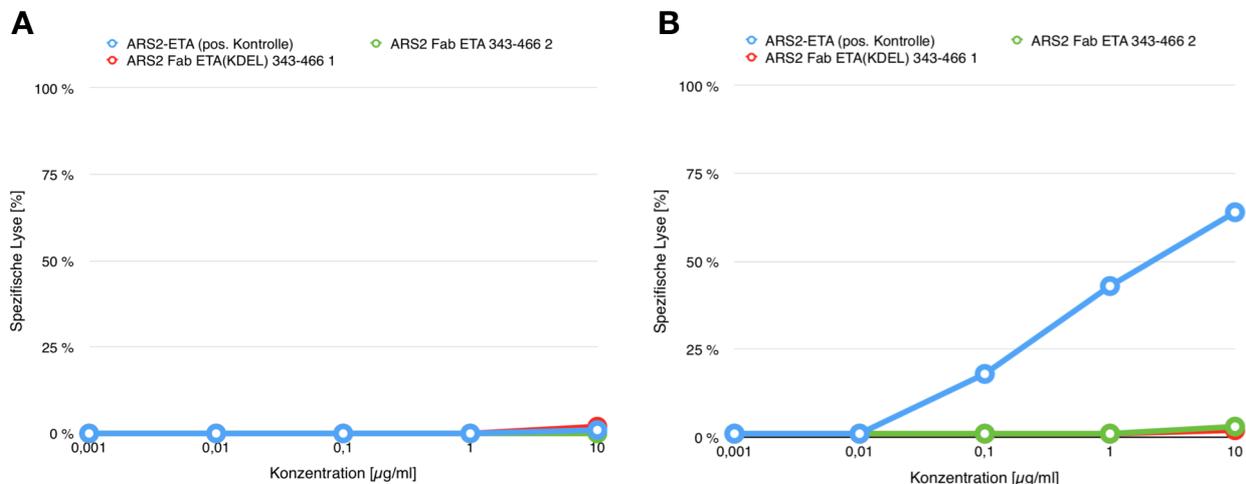
Aus den FACS-Analysen auf den beiden Zelllinien wurde ersichtlich, dass die BAR-Fab-ETA Konstrukte

ARS2 Fab-ETA-KDEL 343-466 1, ARS2 Fab-ETA 343-466 1 sowie ARS2 Fab-ETA 343-466 2

auf der U2932 Zelllinie binden, jedoch nicht auf der HBL-1 Zelllinie. Das spricht, wie schon zuvor bei den BAR-Fab Konstrukten, für eine spezifische Bindung auf ARS2 positiven Tumorzelllinien. Trotz der genetischen Gleichheit von jeweils drei der sechs Konstrukte haben nicht alle gebunden. Erklären lässt sich das, wie schon zuvor bei den BAR-Fab Konstrukten, durch Faltungsprozesse, die bei der Translation stattgefunden haben könnten.

#### 4.2.4 Zytotoxizitäts Analyse

Nachdem im vorherigen Schritt gezeigt wurde, dass drei der ETA, beziehungsweise ETA-KDEL, Konstrukte auf den ARS2 positiven Zellen binden, galt es nun zu überprüfen, ob die Konstrukte auf die Zellen auch wirklich zytotoxisch wirken können. Dazu wurde das LDH Zytotoxizitäts Assay, wie in 3.2.11 beschrieben, durchgeführt. Das Assay wurde einmal mit ARS2 Fab-ETA 343-466 2 und einmal mit ARS2 Fab-ETA-KDEL 343-466 1 durchgeführt. Beide BAR-Fab-ETA-Konstrukte wurden jeweils auf der ARS2 positiven Zelllinie U2932, sowie auf der ARS2 negativen Zelllinie HBL-1 getestet. Die Konzentration der Konstrukte startete bei 10 µg/ml und sank dann in 10er Potenzen. Die Inkubationszeit betrug 24 Stunden. Als positiv Kontrolle wurde ARS2-ETA verwendet [164].



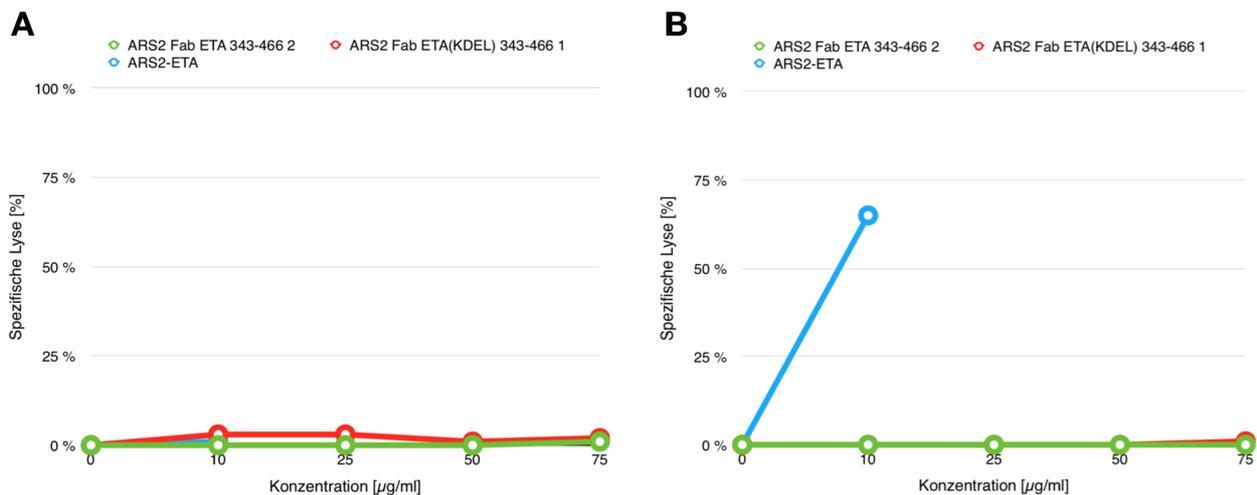
**Abbildung 34: Analyse des LDH Zytotoxizitätsassays der Konstrukte ARS2 Fab-ETA 343-466 2 und ARS2 Fab-ETA-KDEL 343-466 1 auf der HBL-1, sowie der U2932 Zelllinie (24 Stunden)**

**A: HBL-1** Auf der Abszisse ist die Konzentration der einzelnen Konstrukte in µg/ml aufgetragen. Auf der Ordinate ist die spezifische Lyse der Konstrukte aufgetragen. Die blaue Kurve zeigt die positiv Kontrolle ARS2-ETA. Die grüne Kurve zeigt das Konstrukt ARS2 Fab-ETA 343-466 2. Die rote Kurve zeigt das Konstrukt ARS2 Fab-ETA-KDEL 343-466 1.

**B: U2932** Auf der Abszisse ist die Konzentration der einzelnen Konstrukte in µg/ml aufgetragen. Auf der Ordinate ist die spezifische Lyse der Konstrukte aufgetragen. Die blaue Kurve zeigt die positiv Kontrolle ARS2-ETA. Die grüne Kurve zeigt das Konstrukt ARS2 Fab-ETA 343-466 2. Die rote Kurve zeigt das Konstrukt ARS2 Fab-ETA-KDEL 343-466 1.

Aus den beiden Analysen wurde ersichtlich, dass keines der zwei Konstrukte auf einer der beiden Zelllinien zu einer deutlichen Zytotoxizität führte. Auf der HBL-1 Zelllinie lässt sich das durch die zuvor gezeigte fehlende Bindung der Konstrukte erklären.

Auf der U2932 Zelllinie ist das jedoch keine Erklärung. Die Vermutung war zunächst, dass das Problem die zu niedrige Konzentration oder zu kurze Inkubationszeit der Konstrukte auf den Zellen war. Deshalb wurde im nächsten Schritt das Assay nochmal mit denselben Konstrukten mit einer Startkonzentration von 75 µg/ml und einer Inkubationszeit von 48 Stunden durchgeführt, um dieser Vermutung nachzugehen.



**Abbildung 35: Analyse des LDH Zytotoxizitätsassays der Konstrukte ARS2 Fab-ETA 343-466 2 und ARS2 Fab-ETA-KDEL 343-466 1 auf der HBL-1, sowie der U2932 Zelllinie (48 Stunden)**

**A: HBL-1** Auf der Abszisse ist die Konzentration der einzelnen Konstrukte in µg/ml aufgetragen. Auf der Ordinate ist die spezifische Lyse der Konstrukte aufgetragen. Die blaue Kurve zeigt die positiv Kontrolle ARS2-ETA. Die grüne Kurve zeigt das Konstrukt ARS2 Fab-ETA 343-466 2. Die rote Kurve zeigt das Konstrukt ARS2 Fab-ETA-KDEL 343-466 1.

**B: U2932** Auf der Abszisse ist die Konzentration der einzelnen Konstrukte in µg/ml aufgetragen. Auf der Ordinate ist die spezifische Lyse der Konstrukte aufgetragen. Die blaue Kurve zeigt die positiv Kontrolle ARS2-ETA. Die grüne Kurve zeigt das Konstrukt ARS2 Fab-ETA 343-466 2. Die rote Kurve zeigt das Konstrukt ARS2 Fab-ETA-KDEL 343-466 1.

Aus den Assays nach 48 Stunden Inkubation mit höherer Konzentration wurde klar, dass der Grund für die fehlende Zytotoxizität nicht eine zu geringe Konzentration oder zu kurze Inkubationszeit war.

Da das ETA beziehungsweise das ETA-KDEL nur intrazellulär zytotoxisch wirkt, gab es Grund zur Annahme, dass die Ursache vielleicht eine fehlende Internalisierung der Konstrukte seitens der Zellen war [128,148].

## 4.2.5 Oberflächenfärbung zur Kontrolle der Bindung und Internalisierung

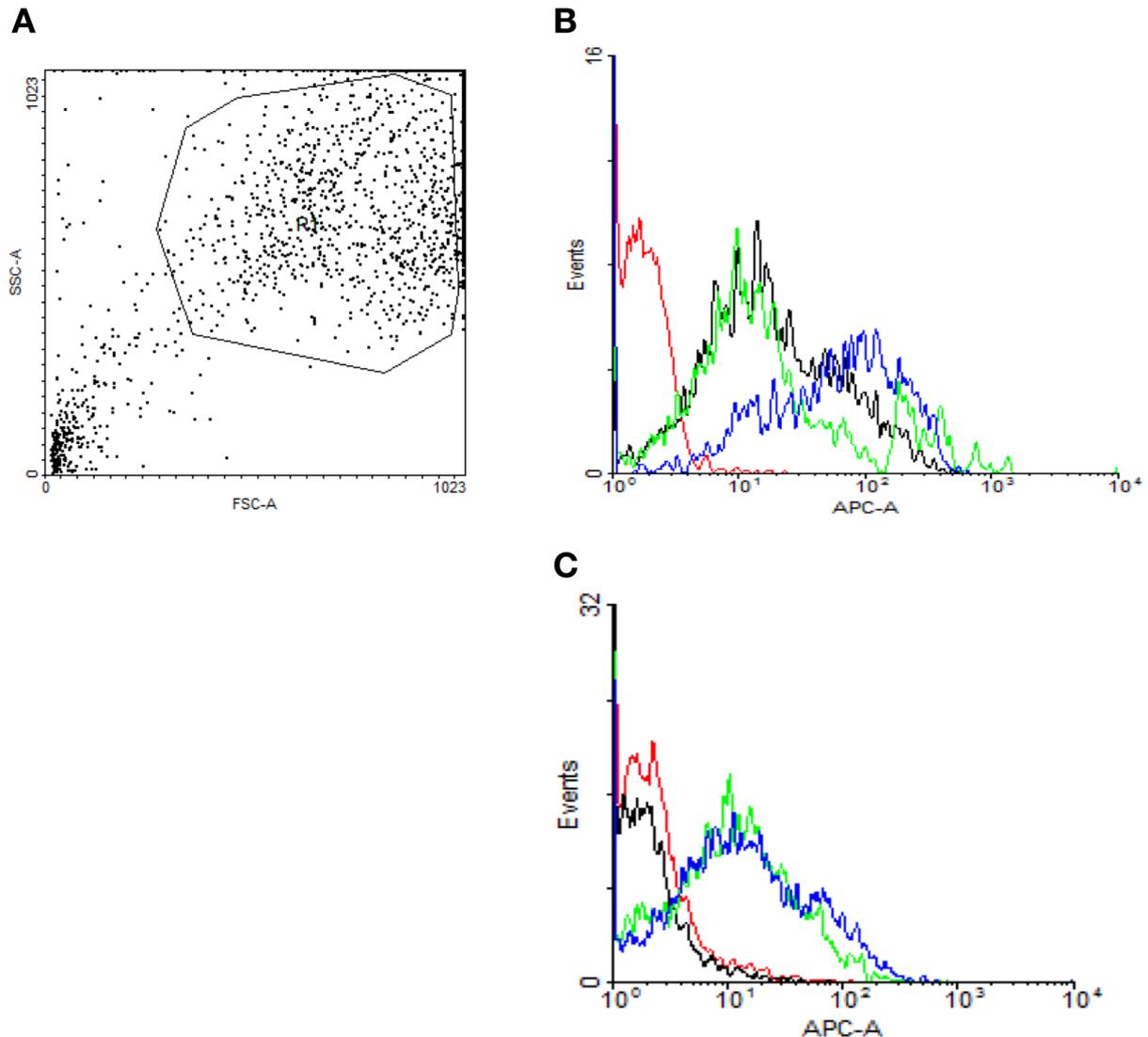
Nachdem bei dem vorausgegangenen Zytotoxizitätsassay keine Zytotoxizität gezeigt werden konnte, war nun die Idee, dass der Grund dafür die fehlende Internalisierung der Konstrukte sein könnte. Um dies zu untersuchen, wurde eine weitere Oberflächenfärbung zur zusätzlichen Kontrolle der Internalisierung durchgeführt. Es wurden zwei Analysen durchgeführt:

Bei der ersten inkubierten die Zellen für null Minuten bei Raumtemperatur mit den Konstrukten.

Bei der zweiten inkubierten die Zellen für 60 Minuten bei Raumtemperatur mit den Konstrukten. Hier sollten die Konstrukte von den Zellen internalisiert werden.

Beide Analysen wurden auf der U2932 Zelllinie durchgeführt.

Die Analyse wurde mit dem Konstrukt ARS2 Fab-ETA 343-466 2 und ARS2 Fab-ETA-KDEL 343-466 1 durchgeführt, welche sich zuvor auch schon als Binder auf den Zellen erwiesen hatten. Als positiv Kontrolle wurde ARS2-ETA verwendet [164]. Als primärer Antikörper wurde auf Grund des His-Tags der Konstrukte der Penta-His Antibody, BSA-free, mouse monoclonal IgG1 von Qiagen (Hilden, Germany) verwendet. Des Weiteren wurden der sekundäre Antikörper Anti-mouse Biotin AK, sowie der Farbstoff APC Streptavidin verwendet.



**Abbildung 36: Dotplot und Histogramm der Oberflächenfärbung der U2932 Zelllinie nach 0 Minuten, sowie 60 Minuten Inkubation mit den Konstrukten ARS2 Fab-ETA 343-466 2 und ARS2 Fab-ETA-KDEL 343-466 1**  
**A: Dotplot nach 0 Minuten** Dotplot der U2932 Zelllinie. Auf der Abszisse ist der forward scatter aufgetragen (FSC-A). Auf der Ordinate ist der sideward scatter aufgetragen (SSC-A). Es wurde eine Gate R1 angelegt.  
**B: Histogramm nach 0 Minuten** Histogramm der Analyse der U2932 Zelllinie. Auf der Abszisse ist die Emission des Allophycocyanin Farbstoffes aufgetragen (APC-A). Auf der Ordinate sind die Events aufgetragen. Die schwarze Kurve zeigt die positiv Kontrolle ARS2-ETA. Die hellgrüne Kurve zeigt das Konstrukt ARS2 Fab-ETA 343-466 2. Die blaue Kurve spiegelt das Konstrukt ARS2 Fab-ETA-KDEL 343-466 1 wider. Die rote Kurve spiegelt den Leerwert wider.  
**C: Histogramm nach 60 Minuten** Histogramm der Analyse der U2932 Zelllinie. Auf der Abszisse ist die Emission des Allophycocyanin Farbstoffes aufgetragen (APC-A). Auf der Ordinate sind die Events aufgetragen. Die schwarze Kurve zeigt die positiv Kontrolle ARS2-ETA. Die hellgrüne Kurve zeigt das Konstrukt ARS2 Fab-ETA 343-466 2. Die blaue Kurve spiegelt das Konstrukt ARS2 Fab-ETA-KDEL 343-466 1 wider. Die rote Kurve spiegelt den Leerwert wider.

Da das Signal der beiden ARS2 Fab Konstrukte nach null Minuten, sowie 60 Minuten Inkubation jeweils annähernd gleich stark ist, lässt sich daraus schlussfolgern, dass die Konstrukte weiterhin auf der Zelle gebunden sind und somit nicht von der Zelle internalisiert wurden. Bei der positiv Kontrolle ARS2-ETA wurde das Signal nach 60 Minuten Inkubation bedeutend schwächer, was zeigt, dass die positiv Kontrolle von der Oberfläche der Zelle langsam verschwindet und damit internalisiert wurde [164].

Als mögliche Ursache für die fehlende Internalisierung könnte unter Umständen die bivalente Bindung der BAR-Fab beziehungsweise BAR-Fab-ETA Konstrukte verantwortlich sein. Das BAR-Fab Konstrukt besitzt zwei Domänen mit derselben ARS2 Sequenz. Beide Regionen können somit potenziell an den B-Zell-Rezeptor binden. Die Vermutung war, dass eine mögliche Doppelbindung des Konstruktes an zwei B-Zell-Rezeptoren einer Zelle zur gleichen Zeit zu Problemen bei der Internalisierung führt.

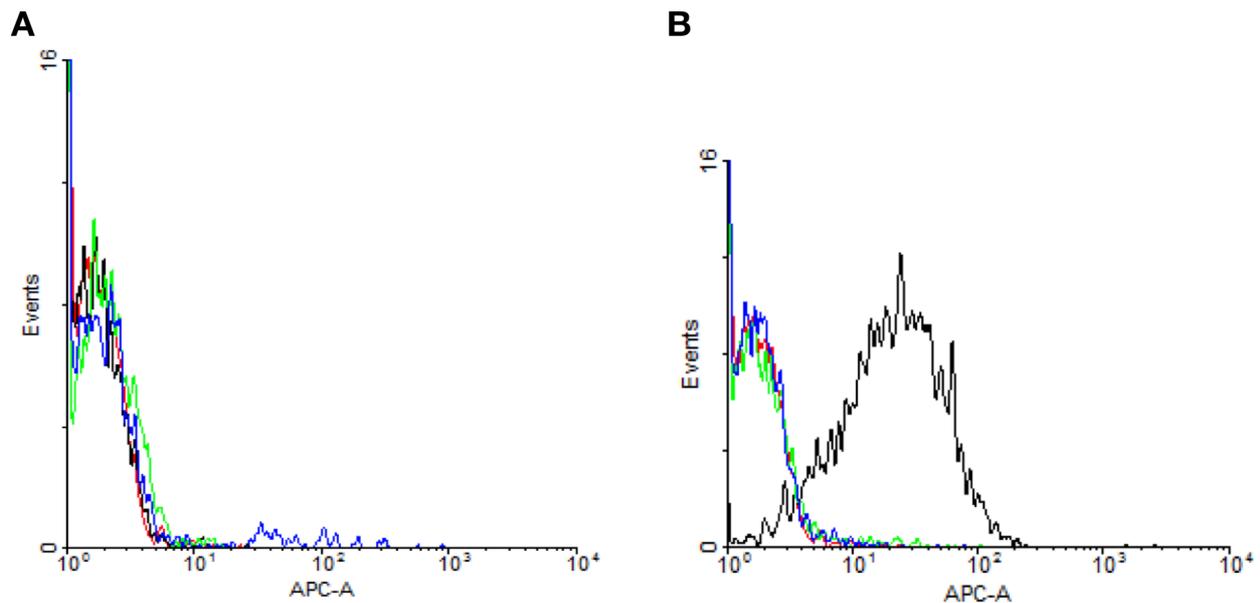
## **4.2.6 Intrazellulärfärbung zur Kontrolle der Internalisierung**

Um den Verdacht, dass die Konstrukte nicht internalisiert werden, wie es durch die Oberflächenfärbung bereits zu vermuten war, zu bestätigen, wurde zusätzlich noch eine Intrazellulärfärbung durchgeführt. Es wurden zwei Analysen durchgeführt, beide fanden auf der U2932 Zelllinie statt. Es wurden die Konstrukte ARS2 Fab-ETA 343-466 2 und ARS2 Fab-ETA-KDEL 343-466 1, sowie die positiv Kontrolle ARS2-ETA getestet [164].

Bei der ersten inkubierten die Konstrukte für null Minuten bei Raumtemperatur mit den Zellen.

Bei der zweiten inkubierten die Konstrukte für 60 Minuten bei Raumtemperatur mit den Zellen.

Als primärer Antikörper wurde auf Grund des His-Tags der Konstrukte der Penta-His Antibody, BSA-free, mouse monoclonal IgG1 von Qiagen (Hilden, Germany) verwendet. Des Weiteren wurden der sekundäre Antikörper Anti-mouse Biotin AK, sowie der Farbstoff Streptavidin RPE, verwendet.



**Abbildung 37: Histogramm der Intrazellulärfärbung der U2932 Zelllinie nach 0 Minuten, sowie nach 60 Minuten Inkubation mit den Konstrukten ARS2 Fab-ETA 343-466 2 und ARS2 Fab-ETA-KDEL 343-466 1 sowie der positiv Kontrolle ARS2-ETA bei Raumtemperatur**

**A: 0 Minuten** Histogramm der Analyse der U2932 Zelllinie nach nullminütiger Inkubation. Auf der Abszisse ist die Emission des Phycoerythrin Farbstoffes (PE-A) aufgetragen. Auf der Ordinate sind die Events aufgetragen. Die rote Kurve zeigt den Leerwert. Die schwarze Kurve zeigt die positiv Kontrolle ARS2-ETA. Die grüne Kurve steht für das Konstrukt ARS2 Fab-ETA 343-466 2 und die blaue Kurve für das Konstrukt ARS2 Fab-ETA-KDEL 343-466 1.

**B: 60 Minuten** Histogramm der Analyse der U2932 Zelllinie nach 60-minütiger Inkubation. Auf der Abszisse ist die Emission des Phycoerythrin Farbstoffes (PE-A) aufgetragen. Auf der Ordinate sind die Events aufgetragen. Die rote Kurve zeigt den Leerwert. Die schwarze Kurve zeigt die positiv Kontrolle ARS2-ETA. Die grüne Kurve steht für das Konstrukt ARS2 Fab-ETA 343-466 2 und die blaue Kurve für das Konstrukt ARS2 Fab-ETA-KDEL 343-466 1.

Aus beiden Analysen wird ersichtlich, dass nach null Minuten Inkubation weder die Positiv Kontrolle, noch die Konstrukte selbst internalisiert werden.

Nach 60-minütiger Inkubation kommt es bei der positiv Kontrolle ARS2-ETA jedoch zu einem Signalanstieg, was eine intrazelluläre Anreicherung und damit auch Internalisierung beweist. Die zwei BAR-Fab-ETA Konstrukte ARS2 Fab-ETA 343-466 2 und ARS2 Fab-ETA-KDEL 343-466 1 zeigen hingegen keinen Signalanstieg. Damit ist klar gezeigt, dass die Konstrukte nicht internalisiert werden und sich somit auch nicht im Intrazellulärraum anreichern können. Der Grund für die fehlende Zytotoxizität war somit gefunden und bestätigt.

### 4.3 BAR-Schwerketten und BAR-Schwerketten-ETA Konstrukte

Die Schwerketten Konstrukte dienen als Ansatz für die Lösung des Problems, dass die BAR-Fab-ETA Konstrukte nicht von der Zelle internalisiert wurden und somit keine Zytotoxizität zeigen konnten. Im Detail war die Idee, dass die einfache Bindung an einem B-Zell-Rezeptor im Gegensatz zu der doppelten Bindung an zwei B-Zell-Rezeptoren, die durch die Bivalenz der bisherigen Konstrukte zustande kam,

auf den Zellen die Internalisierung womöglich vereinfachen könnte. Dazu sollten Konstrukte kloniert werden, die nur aus der VH Domäne, sowie der CH1 Domäne und fakultativ dem ETA Toxin bestehen. Die VH Domäne sollte, wie schon bei den vorherigen Konstrukten, durch eine ARS2 Sequenz vertreten werden. Verwendet wurde dazu die gleiche Sequenz, die in den vorherigen Analysen schon eine Bindung auf den U2932 Zellen zeigte, also die AA 343-466.

## Vorgehensweise

Als Ausgangspunkt für die Klonierung der BAR-Schwerketten Konstrukte wurde auf die zuvor klonierten BAR-Fab Konstrukte zurückgegriffen. Die Leichtkette (variable sowie auch konstante Domäne) und deren Signalsequenz wurden quasi als Ganzes aus dem Vektor geschnitten und dieser dann, mit enthaltener Schwerkette, wieder mit sich selbst ligiert. Im Anschluss an die Expression sollte dann erneut auf Bindung getestet werden und anschließend ebenfalls die Internalisierung und Zytotoxizität überprüft werden.

### 4.3.1 Klonierung der BAR-Schwerketten Konstrukte

Als Ausgangsvektoren für die Klonierung dienten folgende pCES-1 Vektoren:

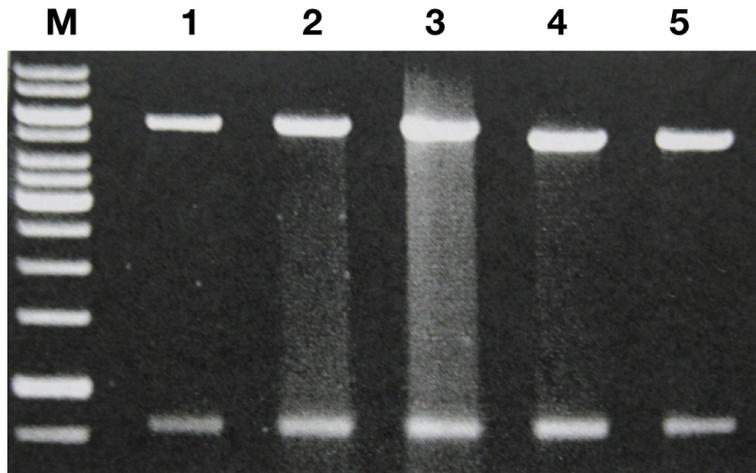
Ausgangsvektor	Konstrukt
pCES VH 343-466 (4)	ARS2 øVL/CL 343-466
pCES ETA 343-466 2	ARS2 øVL/CL 343-466 ETA
pCES ETA-KDEL 343-466 1	ARS2 øVL/CL 343-466 ETA-KDEL

**Tabelle 22: Ausgangsvektoren für die BAR-Schwerketten Konstrukte**

Zunächst wurden 2 µg der zwei Vektoren pCES ETA 343-466 2 und pCES ETA-KDEL 343-466 1 mit den Restriktionsenzymen Hind3 und Asc1 unter zu Hilfenahme des Buffer Tango verdaut. Hind3 schneidet vor der Signalsequenz der VL Domäne, Asc1 schneidet vor der Signalsequenz der VH Domäne. Damit wird die gesamte leichte Kette herausgeschnitten. Übrig bleibt die Schwerkette, bestehend aus VH und CH1 Domäne, sowie die ETA Sequenz.

Der Vektor pCES VH 343-466 (4) wurde nur mit Hind3 verdaut, da in dem Stuffer, der an der Stelle der Leichtkette zwischen der ApaL1 und Xho1 Schnittstelle sitzt, noch eine weitere Hind3 Schnittstelle enthalten ist. Somit wird die Signalsequenz für die Leichtkette ebenfalls entfernt. Es bleibt nur die Schwerkette übrig.

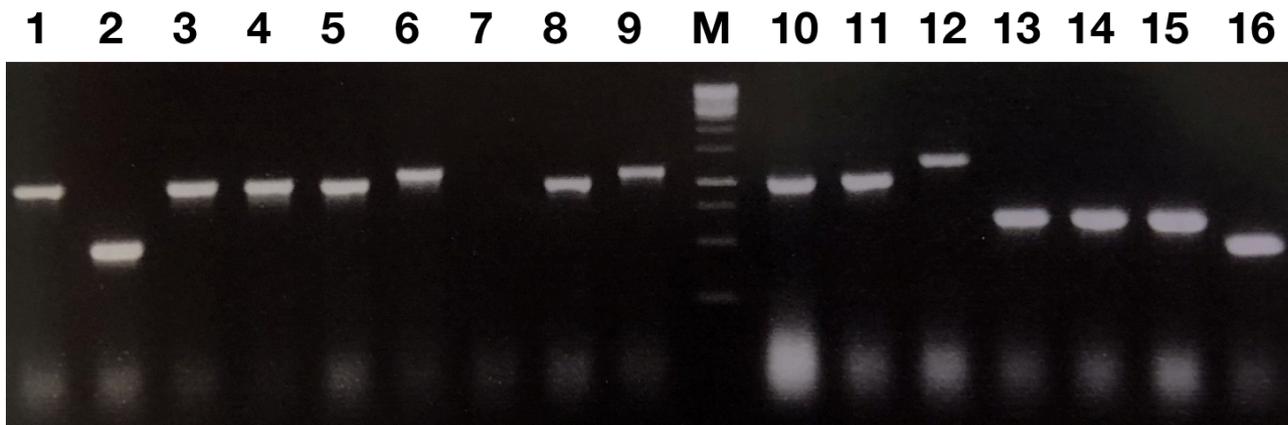
Da Hind3 und Asc1 unterschiedliche sticky ends verursachen, wurden diese zunächst noch mit Hilfe des Klenow-Fragments für die Ligation angeglichen. Die geschnittene Vektor-DNA wurde dann zusammen mit einem 1 kbp Längenmarker über ein einprozentiges Agarosegel aufgetrennt, ausgeschnitten und dann aufgereinigt.



**Abbildung 38:** Agarosegel der mit Hind3, Klenow-Fragment (und Asc1) verdauten Vektoren pCES VH 343-466 (4), pCES ETA 343-466 2 sowie pCES ETA(KDEL) 343-466 1  
 Links ist der 1 kbp Längenmarker aufgetragen (M). In der mit eins beschrifteten Laufspur ist der Vektor pCES VH 343-466 (4) aufgetragen. In der Laufspur mit Beschriftung vier ist der Vektor pCES ETA 343-466 2 aufgetragen. In der Laufspur mit der Beschriftung fünf ist der Vektor pCES ETA-KDEL 343-466 1 aufgetragen. Ausgeschnitten wurde die Vektor-DNA, die durch die Banden auf Höhe von ca. 5500 bp repräsentiert wird.

In einem nächsten Schritt wurde nun die Selbstligation der übrig gebliebenen Vektor-DNA durchgeführt. Es wurden 50 ng verwendet. Im Anschluss an die Ligation wurden die nun fertig klonierten pCES-1 Vektoren in TG 1 Bakterien mit Zwischenkultur transformiert. Die Bakterien wurden dann auf 2xTY-AG-Agar ausplattiert.

Von den Kolonien auf den drei Platten wurde dann jeweils von einigen eine Kolonien-PCR mit den beiden Primern M13 reverse und CH1-3' durchgeführt. Die PCR Produkte wurden dann zusammen mit dem 1 kbp Längenmarker auf einem einprozentigem Agarosegel aufgetragen.



**Abbildung 39: Agarosegel der Kolonien PCR zur Überprüfung der Selbstligation der BAR-Schwerketten pCES Vektoren**

Mittig ist der 1 kbp Längenmarker aufgetragen (M). In Laufspur Nummer 1 ist pCES VH 343-466 (4) nach Selbstligation aufgetragen. Auf Höhe von circa 1100 bp ist eine Bande zu erkennen. In Laufspur Nummer 14 ist pCES-ETA-KDEL 343-466 1 nach Selbstligation aufgetragen. Auf Höhe von ca. 600 bp ist eine Bande zu erkennen. In Laufspur Nummer 15 ist pCES-ETA 343-466 2 nach Selbstligation aufgetragen. Ebenfalls auf Höhe von circa 600 bp ist eine Bande zu erkennen.

Die Ligationen wurden dann in jeweils vier ml 2xTY-AG-Medium angeimpft. Anschließend wurde die DNA mittels Minipräparation isoliert. Die DNA wurde dann mit Hilfe der Primer M13 reverse und CH1-3' sequenziert. Die Sequenzierung konnte die Richtigkeit der Klone bestätigen.

Fertig klonierte BAR-Schwerketten Klone
pCES ARS2 øVL/CL 343-466
pCES ARS2 øVL/CL 343-466 ETA
pCES ARS2 øVL/CL 343-466 ETA-KDEL

**Tabelle 23: Fertig klonierte BAR-Schwerketten Klone**

## 4.3.2 Expression der BAR-Schwerketten Konstrukte

### 4.3.2.1 Induktion und Proteinisolation

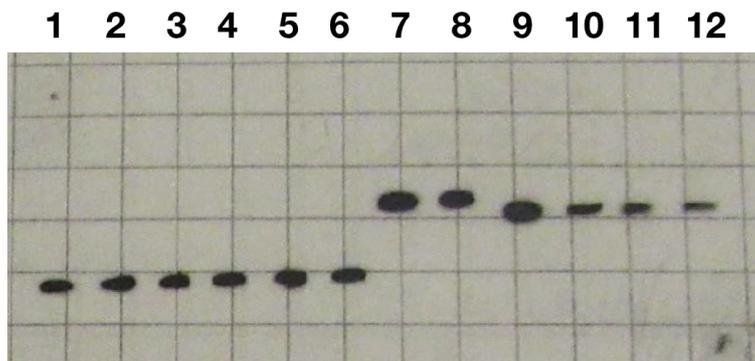
Fertige Konstrukte:
ARS2 øVL/CL 343-466
ARS2 øVL/CL 343-466 ETA
ARS2 øVL/CL 343-466 ETA-KDEL

**Tabelle 24: BAR-Schwerketten Konstrukte**

Die nun vorliegenden Klone wurden mittels IPTG induziert. Dazu wurden die vier ml Flüssigkulturen aus 4.3.1 verwendet. Anschließend wurden die Konstrukte mit Hilfe der TALON beads und des enthaltenen His-Tags isoliert und die Proteinkonzentration mittels photometrischer Analyse bestimmt.

#### 4.3.2.2 Western Blot und Immunfärbung

Die nun isolierten Konstrukte wurden auf einem zwölfprozentigem SDS-Polyacrylamidgel zusammen mit dem 1 kbp Längenmarker aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF Membran geblottet. Die Membran wurde einer Immunfärbung unterzogen. Aufgrund des His-Tags der Konstrukte wurde als primärer Antikörper der Penta-His Antibody, BSA-free, mouse monoclonal IgG1 von Qiagen (Hilden, Germany) verwendet. Anschließend wurde die Membran auf einem Hyperfilm abgebildet.



**Abbildung 40: Hyperfilm der Western Blot Analyse der Konstrukte ARS2 øVL/CL 343-466, ARS2 øVL/CL 343-466 ETA und ARS2 øVL/CL ETA-KDEL**

In Spur eins und zwei ist das Konstrukt ARS2 øVL/CL 343-466 aufgetragen. In Spur neun und zehn ist das Konstrukt ARS2 øVL/CL 343-466 ETA aufgetragen. In Spur elf und zwölf ist das Konstrukt ARS2 øVL/CL 343-466 ETA-KDEL aufgetragen.

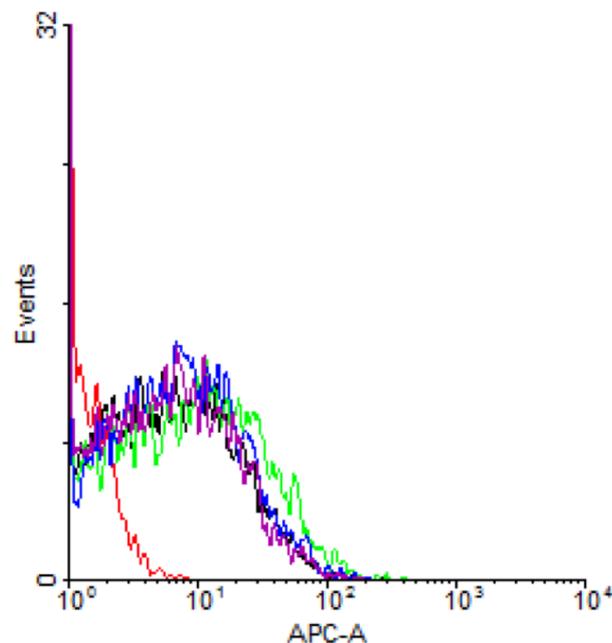
Mit der Western Blot Analyse konnte erfolgreich gezeigt werden, dass die Proteinexpression aller Klone erfolgreich war. Die durch die Sequenzlänge zu erwartende Größe der Konstrukte stimmte mit der tatsächlichen Größe der Konstrukte, die durch die Lauflänge im Western Blot dargestellt wird, überein. Ebenfalls wurde damit der Erfolg der zuvor abgelaufenen Induktion und Proteinisolation bestätigt.

#### 4.3.3 Oberflächenfärbung zur Kontrolle der Bindung

Um nun zu überprüfen, ob die Schwereketten-Konstrukte ARS2 øVL/CL 343-466, ARS2 øVL/CL 343-466 ETA und ARS2 øVL/CL 343-466 ETA-KDEL auch auf den Zellen binden, wurde eine Oberflächenfärbung durchgeführt.

Bei der Analyse inkubierten die Konstrukte für kurze Zeit (weniger als 5 Minuten) bei Raumtemperatur mit den Zellen. Als primärer Antikörper wurde auf Grund des His-Tags der Konstrukte der Penta-His

Antibody, BSA-free, mouse monoclonal IgG1 von Qiagen (Hilden, Germany) verwendet. Des Weiteren wurden der sekundäre Antikörper Anti-mouse Biotin AK sowie der Farbstoff APC Streptavidin verwendet.



**Abbildung 41: Histogramm der Oberflächenfärbung der U2932 Zelllinie nach 0 Minuten Inkubation mit den Konstrukten ARS2 øVL/CL 343-466, ARS2 øVL/CL 343-466 ETA und ARS2 øVL/CL 343-466 ETA-KDEL bei Raumtemperatur**

Histogramm der Analyse der U2932 Zelllinie nach 0 Minuten Inkubation. Auf der Abszisse ist die Emission des Allophycocyanin Farbstoffes aufgetragen (APC-A). Auf der Ordinate ist die Anzahl der Events aufgetragen. Die rote Kurve stellt den Leerwert da. Die schwarze Kurve stellt das Konstrukt ARS2 øVL/CL 343-466 dar. Die blaue Kurve stellt das Konstrukt ARS2 øVL/CL 343-466 ETA dar. Die lila Kurve stellt das Konstrukt ARS2 øVL/CL 343-466 ETA-KDEL dar.

Aus den Ergebnissen ließ sich ableiten, dass alle Konstrukte auf der Oberfläche der Zellen der U2932 Zelllinie gebunden haben.

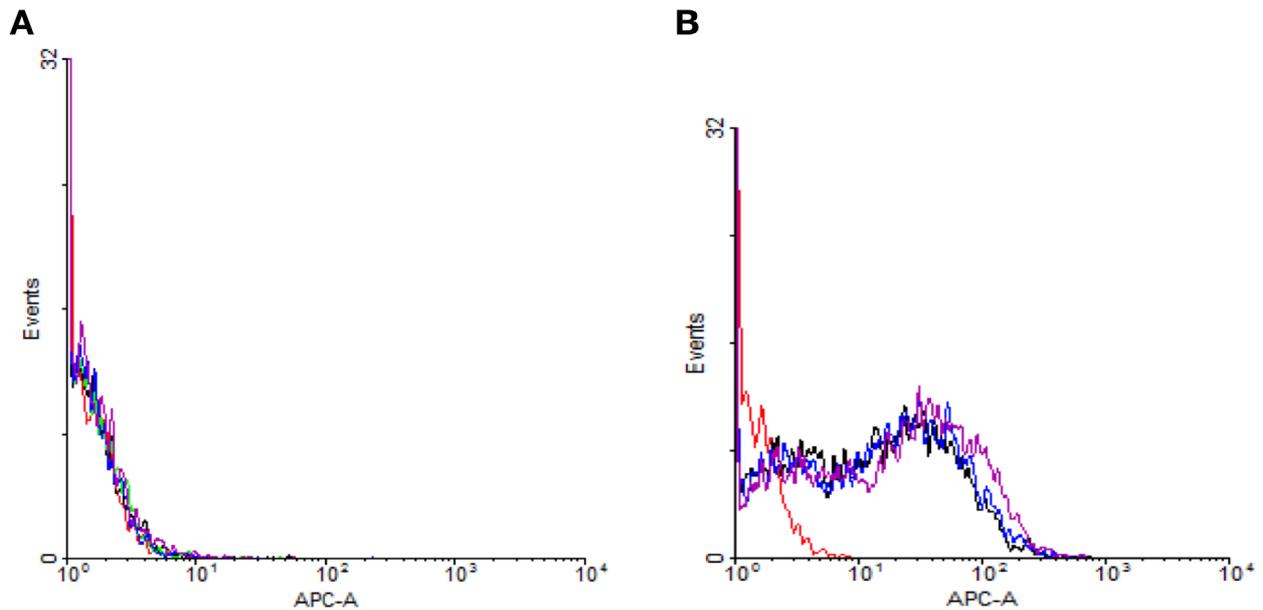
#### 4.3.4 Intrazellulärfärbung zur Kontrolle der Internalisierung

Nun war der nächste Schritt zu zeigen, dass die Konstrukte, die zuvor erfolgreich auf den U2932 Zellen auf Bindung getestet wurden, auch tatsächlich von den Zellen internalisiert werden. Dazu wurden zwei Intrazellulärfärbungen durchgeführt.

Bei der ersten inkubierten die Konstrukte null Minuten bei Raumtemperatur mit den Zellen.

Bei der zweiten inkubierten die Konstrukte 60 Minuten bei Raumtemperatur mit den Zellen.

Als primärer Antikörper wurde auf Grund des His-Tags der Konstrukte der Penta-His Antibody, BSA-free, mouse monoclonal IgG1 von Qiagen (Hilden, Germany) verwendet. Des Weiteren wurde der Anti-IgG1-APC, mouse von Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D) als sekundärer Antikörper sowie auch als Fluoreszenzfarbstoff verwendet.



**Abbildung 42: Histogramm der Intrazellulärfärbung der U2932 Zelllinie nach 0 Minuten, sowie nach 60 Minuten Inkubation mit den Konstrukten ARS2 øVL/CL 343-466, ARS2 øVL/CL 343-466 ETA und ARS2 øVL/CL 343-466 ETA-KDEL bei Raumtemperatur**

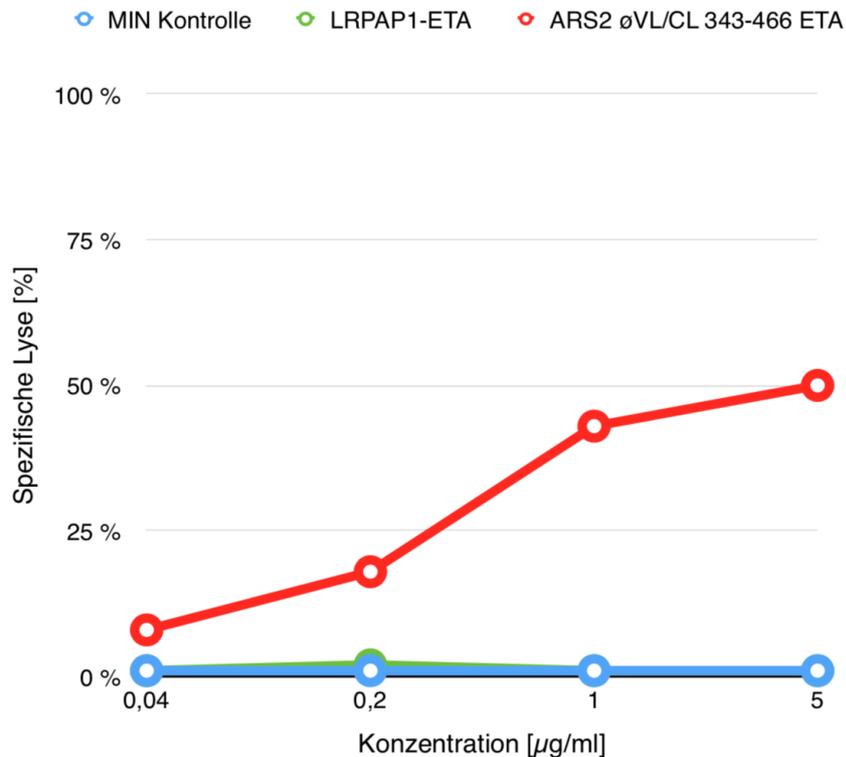
**A: 0 Minuten** Histogramm der U2932 Zelllinie nach 0 Minuten Inkubation. Auf der Abszisse ist die Emission des APC Farbstoffes aufgetragen (APC-A). Auf der Ordinate ist die Anzahl der Events aufgetragen. Die rote Kurve stellt den Leerwert da. Die schwarze Kurve stellt das Konstrukt ARS2 øVL/CL 343-466 dar. Die blaue Kurve stellt das Konstrukt ARS2 øVL/CL 343-466 ETA dar. Die lila Kurve stellt das Konstrukt ARS2 øVL/CL 343-466 ETA-KDEL dar.

**B: 60 Minuten** Histogramm der U2932 Zelllinie nach 60 Minuten Inkubation. Auf der Abszisse ist die Emission des APC Farbstoffes aufgetragen (APC-A). Auf der Ordinate ist die Anzahl der Events aufgetragen. Die rote Kurve stellt den Leerwert da. Die schwarze Kurve stellt das Konstrukt ARS2 øVL/CL 343-466 dar. Die blaue Kurve stellt das Konstrukt ARS2 øVL/CL 343-466 ETA dar. Die lila Kurve stellt das Konstrukt ARS2 øVL/CL 343-466 ETA-KDEL dar.

Nach 60 Minuten Inkubation lässt sich im Vergleich zur nullminütigen Inkubation ein klarer Signalanstieg bei der Intrazellulärfärbung beobachten. Daraus ließ sich nun eindeutig schließen, dass alle drei BAR-Schwerketten Konstrukte - sowohl die ohne als auch die mit gekoppeltem Toxin - nach 60 Minuten Inkubation von den Zellen erfolgreich internalisiert worden sind.

### 4.3.5 Zytotoxizitätsassay

Nun galt es zu überprüfen, ob die Schwerketten Konstrukte nach ihrer Internalisierung auch tatsächlich zu einer Zytotoxizität der Zellen führen. Dazu wurde ein LDH Zytotoxizitätsassay durchgeführt. Die Inkubationszeit betrug 24 Stunden. Die Startkonzentration betrug 5 µg/ml. Die Analyse wurde mit dem Konstrukt ARS2 øVL/CL 343-466 ETA durchgeführt. Zusätzlich wurde ein LRPAP1-ETA Konstrukt getestet, welches als negativ Kontrolle diente [164]. Die verwendeten Zellen gehörten der U2932 Zelllinie an.



**Abbildung 43: Analyse des LDH Zytotoxizitätsassays der Konstrukte ARS2 øVL/CL 343-466 ETA und LRPAP1-ETA auf der U2932 Zelllinie (24 Stunden)**

Auf der Abszisse ist die verwendete Konzentration der Konstrukte in  $\mu\text{g/ml}$  aufgetragen. Die Ordinate zeigt die spezifische Lyse. Die rote Kurve zeigt das Konstrukt ARS2 øVL/CL 343-466 ETA. Die grüne Kurve zeigt LRPAP1-ETA. Die blaue Kurve zeigt die Minimallyse.

Aus der Analyse wurde ersichtlich, dass das Konstrukt ARS2 øVL/CL 343-466 ETA zu einer deutlichen Zytotoxizität auf der U2932 Zelllinie führte. Außerdem zeigte das Experiment, dass Toxine, die nicht an ARS2 gekoppelt sind, sondern an ein anderes Protein (in diesem Fall LRPAP-1), zu keiner Zytotoxizität auf der U2932 Zelllinie führten.

## 4.4 BAR Antikörper

In den vorherigen Experimenten konnte ausgiebig gezeigt werden, dass BAR-Konstrukte, welche die ARS2 Sequenz AA343-466 an Stelle der variablen Domänen besitzen, erfolgreich auf Zellen der Zelllinie U2932 binden. Außerdem konnte auch gezeigt werden, dass bei Beschränkung auf die Schwereketten, das Konstrukt von den Zellen internalisiert wird und somit zytotoxisch wirken kann.

Nun war die nächste Idee sich wieder auf die bivalente Bindung auf den Zellen zu konzentrieren. Da es hier zwar nicht zu einer Internalisierung, jedoch aber zu einer starken Bindung kam (siehe 4.2.3), war der Plan einen kompletten, löslichen IgG1 Antikörper mit der ARS2 Sequenz AA 343-466 als

Äquivalent der variablen Domänen zu entwickeln. Als Vorlage für das Konstrukt sollte mehr oder weniger das Rituximab dienen [105].

Der Antikörper wäre nicht auf eine Internalisierung angewiesen, sondern könnte über die ADCC seine Wirkung entfalten. Im Unterschied zu den bisherigen Konstrukten wird der Antikörper dann jedoch auch auf entsprechende Effektorzellen, in unserem Fall PBMCs, angewiesen sein.

### **Vorgehensweise**

In einem ersten Schritt wurde die ARS2 Sequenz AA 343-466 zunächst wieder mit spezifischen passenden Schnittstellen für die spätere Klonierung versehen.

Nun folgte die Klonierung, die zunächst mit der TA Klonierung begann und von den notwendigen Mutagenesen gefolgt wurde. Die Klonierung im engeren Sinn konnte dann in drei Schritte unterteilt werden:

Die Schwerekette wurde als erstes als ganze Einheit kloniert. Die zuvor für die Schwerekette amplifizierte DNA beinhaltete zum einen die ARS2 Sequenz als Äquivalent zur variablen Domäne, als auch die DNA-Sequenz der konstanten Domänen 1 bis 3 der Schwerekette.

In einem zweiten Schritt wurde dann die Leichtkette kloniert. Die zuvor amplifizierte DNA-Sequenz enthielt hier nur die ARS2 Sequenz als Äquivalent der variablen Domäne inklusive Schnittstellen. Das Ziel beider Klonierungen war der IgG TA mit Apa1 Vektor (siehe 4.4.2.2 Mutagenese des Zielvektors). Im Anschluss wurde dann im dritten Schritt die komplette, für den Antikörper kodierende, Sequenz aus dem IgG TA Vektor in einen pSfi FLAG Vektor kloniert, der von HEK-293T Zellen exprimiert werden kann. Damit war die Klonierung abgeschlossen.

Anschließend wurde das Konstrukt in HEK-293T Zellen transfiziert. Die Zellen sollten dann den Antikörper produzieren und dann in den Überstand sezernieren. Schließlich sollte dann das Konstrukt aus dem Überstand mit Hilfe des FLAG-Tags isoliert werden. Anschließend sollte auf Bindung und Zytotoxizität auf der U2932 Zelllinie sowie einer ARS2 negativen Zelllinie getestet werden. Im Folgenden ist dies ausführlich beschrieben.

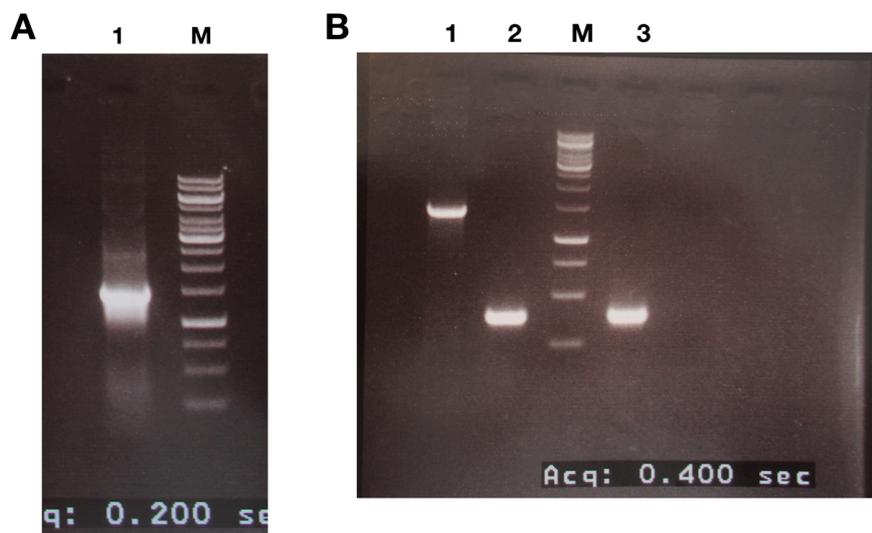
#### **4.4.1 PCR zur Amplifikation spezifischer Schnittstellen**

In einem ersten Schritt wurden zunächst die benötigten ARS2 Sequenzen so mit spezifischen Schnittstellen versehen, sodass sie im Anschluss in den vorgesehenen Vektor an die passenden Stellen kloniert werden können. Die ARS2 Sequenz, um die es sich handelt, ist die Sequenz von Aminosäure 343 bis 466, die in den vorherigen Konstrukten schon verwendet wurde. Es wurden insgesamt zwei verschiedene Reaktionen durchgeführt, bei denen jeweils der Vektor ARS2  $\emptyset$ VL/CL IgG pCES als Template diente:

Name	ARS2 Sequenz	Sense Primer	Antisense Primer
ARS2 VL IgG 343-466	AA 343-466	ARS2 AA343 Age1-s	ARS2 AA466 Nru1-as
ARS2 VH+CH IgG 343-466	AA 343-466	ARS2 AA343 Mun1-s	IgG1-Apa1-as

**Tabelle 25: PCR zur Amplifikation spezifischer Schnittstellen für den BAR-Antikörper**  
Gezeigt sind die entsprechende ARS2 Sequenz und die dazu passenden Primer

Anschließend wurden jeweils 10 µl der zwei Reaktionen auf jeweils einem einprozentigem Agarose-Gel aufgetragen und zusammen mit dem 1 kbp Längenmarker laufen gelassen.



**Abbildung 44: Agarosegel der PCR zur Amplifikation von ARS2 mit spezifischen Schnittstellen für das IgG Konstrukt**

**A: Schwereketten** Rechts ist der 1 kbp Längenmarker aufgetragen (M). In Laufspur eins ist das PCR Produkt ARS2 VH+CH IgG 343-466 aufgetragen. Es ist eine Bande auf Höhe von circa 1400 bp zu erkennen.

**B: Leichtketten** Mittig ist der 1 kbp Längenmarker aufgetragen (M). In der Laufspur drei ist das PCR Produkt ARS2 VL IgG 343-466 aufgetragen. Es ist eine Bande auf Höhe von circa 350 bp zu erkennen.

Bei dem PCR Produkt ARS2 VL IgG 343-466 handelt es sich um die zuvor erwähnte ARS2 Sequenz, die mit den passenden Schnittstellen Age1 und Nru1 versehen worden ist.

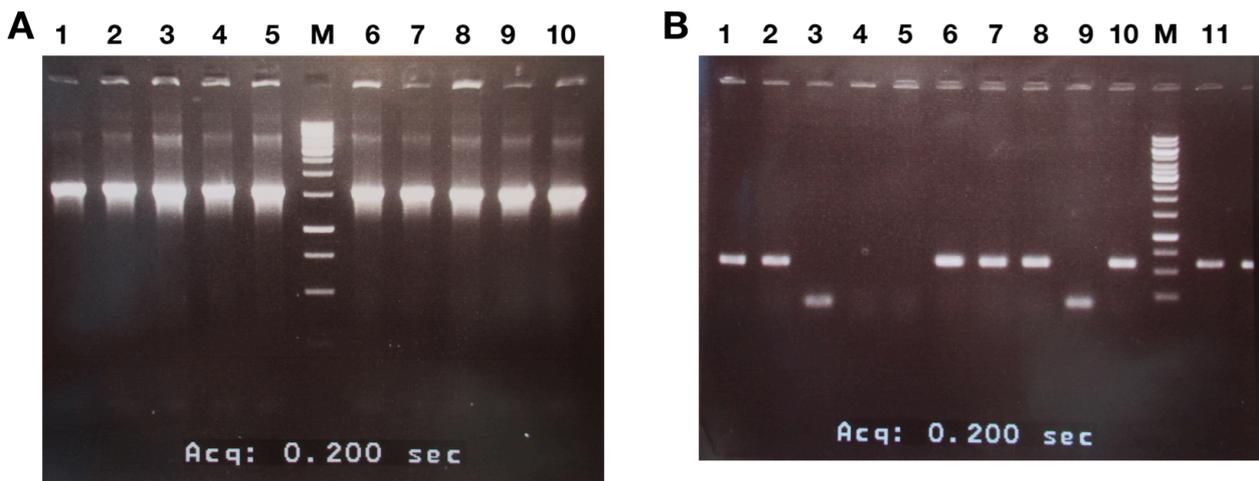
Das Produkt ARS2 VH+CH IgG 343-466 besteht zum einem aus der ARS2 Sequenz als Äquivalent für die variable Schwereketten-Domäne, zum anderen aus den konstanten Domänen eins bis drei der Schwereketten, sowie den passenden Schnittstellen Mun1 und Apa1 für die spätere Klonierung.

## 4.4.2 Klonierung des BAR Antikörpers

### 4.4.2.1 TA Klonierung der PCR Produkte

Zunächst wurden beide zuvor amplifizierten PCR Produkte in einen TA Vektor kloniert. Danach wurde mit der Transformation in DH 5 alpha Bakterien mit Zwischenkultur fortgefahren. Da der TA Vektor Antibiotika Resistenzgene für Ampicillin und Kanamycin besitzt und der pCES Vektor, der als Template bei der vorherigen Amplifikation diente, nur ein Resistenzgen für Ampicillin besitzt, war es strategisch sinnvoller, auf LB-Kanamycin-Agar auszuplattieren.

Um zu kontrollieren, ob die Klonierung erfolgreich war, wurde für jedes PCR Produkt eine Kolonien PCR gefahren. Als Primer wurden M13 forward und M13 reverse verwendet, die jeweils links und rechts nahe des Inserts an die DNA binden. Von jeder Agarplatte der zwei transformierten TA Vektoren wurden mehrere Kolonien überprüft. Die Proben wurden zusammen mit dem 1 kbp Längenmarker auf einem einprozentigem Agarosegel laufen gelassen.



**Abbildung 45: Agarosegel der Kolonien-PCR zur Kontrolle der TA Klonierungen der amplifizierten Schwereketten ARS2 VH+CH IgG 343-466, sowie der Leichtketten ARS2 VL IgG 343-466**

**A: Schwereketten ARS2 VH+CH IgG 343-466** In der Mitte ist der 1 kbp Längenmarker zu erkennen. In den Slots links und rechts des Marker's wurden jeweils amplifizierte Klone aufgetragen. Bei jeder Laufspur ist auf Höhe von circa 1500 bp eine Bande zu sehen. Von all diesen Klonen wurde einer angeimpft.

**B: Leichtketten ARS2 VL IgG 343-466** Rechts ist der 1 kbp Längenmarker aufgetragen (M). In den Slots links des Marker's wurden jeweils amplifizierte Klone aufgetragen. Bei den Laufspuren der Proben vier, fünf, sechs und acht ist auf Höhe von circa 600 bp eine Bande zu erkennen. Von diesen Klonen wurde einer angeimpft.

Anschließend wurde jeweils eine Kolonie von beiden PCR Reaktionen in vier ml LB-Ampicillin-Medium angeimpft. Nachdem die Kulturen über Nacht gewachsen waren, wurde die DNA mittels Minipräparation isoliert.

<b>TA Klone:</b>
ARS2 TA VL 343-466 IgG
ARS2 TA VH+CH 343-466 IgG

**Tabelle 26: BAR-Antikörper TA-Klone**

Im Anschluss daran wurde der Leichtketten TA Klon ARS2 TA VL 343-466 IgG mit dem Primer M13 forward und der Schwereketten TA Klon ARS2 TA VH+CH 343-466 IgG, auf Grund seiner Größe, mit den Primern M13 forward und M13 reverse sequenziert. Die genetische Korrektheit beider Klone konnte durch die Sequenzierung bestätigt werden.

#### **4.4.2.2 Mutagenesen**

In der ARS2 Sequenz, die später Bestandteil der Leichtkette und der Schwereketten werden sollte, waren Sequenzen für eine SmaI und eine Eco47 III Schnittstelle. Da diese jedoch bei den weiteren Klonierungsschritten stören würden, galt es, diese mittels Mutagenese aus den jeweiligen TA Vektoren zu entfernen.

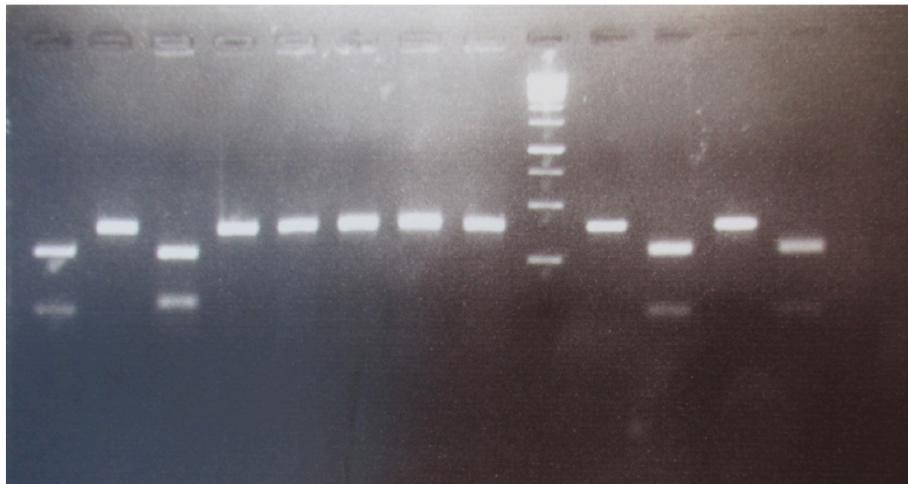
Auch in dem IgG TA Vektor (Zielvektor) befand sich noch eine zweite ApaI Schnittstelle (zusätzlich zu der ApaI Schnittstelle am 3'-Ende der Schwereketten), die bei der späteren Klonierung stören würde, und somit eliminiert werden musste.

#### **SmaI Mutagenesen**

Die SmaI Schnittstelle musste in den TA Vektoren für die Leichtkette und die Schwereketten, also ARS2 TA VL 343-466 IgG und ARS2 TA VH+CH 343-466 IgG, eliminiert werden. Dazu wurde, wie in 3.2.7.7 beschrieben, verfahren. Für die Mutagenese wurden die Primer ARS2 mut SmaI-s und ARS2 mut SmaI-as verwendet. Die Elongationszeit betrug zehn Minuten. Im Anschluss wurden die neu amplifizierten Vektoren in DH 5 alpha Bakterien mit Zwischenkultur transformiert und anschließend auf LB-Amp-Agar ausplattiert.

Zur Kontrolle wurde für jeden Vektor eine Kolonien PCR angesetzt. Als Primer wurden jeweils ARS2 AA 343 ApaI-s und ARS2 AA466 BstE2-as verwendet. Zusätzlich wurden bei der PCR jeweils zwei Mal ARS2 TA VL 343-466 IgG (Vektor vor der Mutagenese) und zwei Mal ARS2 TA VH+CH 343-466 IgG (Vektor vor der Mutagenese) mitgeführt. Nach gelaufener PCR wurde dann mit SmaI unter Zuhilfenahme des Buffer Yellow 1x geschnitten. Nach einer Stunde Inkubation bei 37°C im Brutraum wurden dann alle PCR Proben zusammen mit einem 1 kbp Längenmarker auf ein einprozentiges Agarosegel aufgetragen.

1 2 3 4 5 6 7 8 M 9 10 11 12



**Abbildung 46: Agarosegel der Kolonien-PCR zur Kontrolle der SmaI Mutagenese**

Mittig ist der 1 kbp Längenmarker aufgetragen (M). In den zwei ersten Slots wurden die gepickten Kolonien und deren PCR Produkte des ARS2 TA VH+CH 343-466 IgG Vektors aufgetragen. Bei dem Ersten ist eine Bande in Höhe von circa 300 bp zu sehen; bei dem Zweiten in Höhe von circa 450 bp. Der zweite Klon wurde angeimpft. In den Slots drei bis acht waren gepickte Kolonien und deren PCR Produkte des ARS2 TA VL 343-466 IgG aufgetragen. Bei der ersten dieser Proben ist eine Bande in Höhe von circa 300 bp zu sehen; bei den restlichen in Höhe von circa 450 bp. Ein Klon mit einer 450 bp Bande wurde angeimpft. Rechts des Marker's sind der Reihe nach, die Kontrollen des Vektors ARS2 TA VH+CH 343-466 IgG (zuerst ohne und dann mit SmaI Reaktion), sowie des Vektors ARS2 TA VL 343-466 IgG (zuerst ohne und dann mit SmaI Reaktion) aufgetragen. Bei den Kontrollen ohne Enzymreaktion ist eine 450 bp Bande, bei denen mit Enzymreaktion eine 300 bp Bande zu erkennen.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Mutagenese der Schwereketten und fünf Mutagenesen der Leichtketten funktioniert hatten. Jeweils eine Kolonie der beiden Vektoren wurde dann in vier ml LB-Amp-Medium angeimpft. Im Anschluss wurde die DNA mittels Minipräparation isoliert:

Name
ARS2 TA VL 343-466 IgG mut SmaI
ARS2 TA VH+CH 343-466 IgG mut SmaI

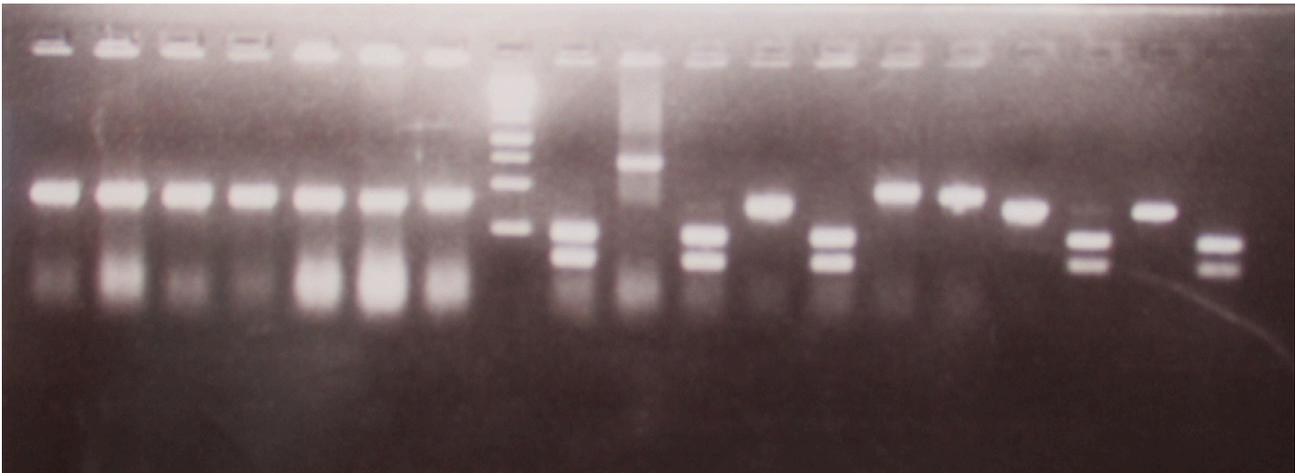
**Tabelle 27: BAR-Antikörper SmaI Mutagenese**

### Eco 47 3 Mutagenesen

Auch die Sequenz für die Eco 47 3 Schnittstelle in der ARS2 Sequenz der TA Vektoren für die Schwereketten und die Leichtketten musste eliminiert werden. Als Ausgangsvektoren dienten ARS2 TA VL 343-466 IgG mut SmaI und ARS2 TA VH+CH 343-466 IgG mut SmaI. Es wurde wie in 3.2.7.7 verfahren. Die verwendeten Primer waren ARS2 mut Eco47 3 -s und ARS2 mut Eco47 3 -as. Die Elongationszeit betrug zehn Minuten. Transformiert wurde in DH 5 alpha Bakterien mit anschließender Ausplattierung auf LB-Amp-Agar. Anschließend wurde die Mutagenese, wie im Methoden Teil beschrieben, kontrolliert. Als Primer für die Kolonien PCR wurden ARS2 AA343 ApaL1-s und ARS2

AA466 BstE2-as verwendet. Als Kontroll-Vektoren dienten ARS2 TA VL 343-466 IgG und ARS2 TA VH+CH 343-466 IgG. Geschnitten wurde nach der PCR mit Eco47 3 unter Zuhilfenahme des Buffer O. Im Anschluss wurden die PCR Produkte zusammen mit dem 1 kbp Längenmarker auf einem einprozentigem Agarosegel laufen gelassen.

**1 2 3 4 5 6 7 M 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18**



**Abbildung 47: Agarosegel der Kolonien-PCR zur Kontrolle der Eco47 3 Mutagenese**

Mittig ist der 1 kbp Längenmarker aufgetragen (M). In den Slots eins bis sieben wurden gepickte Kolonien und deren PCR Produkte des ARS2 TA VL 343-466 IgG mit Sma1 Vektors aufgetragen. Bei allen ist eine Bande auf Höhe von circa 450 bp zu sehen. Einer der Klone wurde angeimpft. In den Slots acht bis 14 waren gepickte Kolonien und deren PCR Produkte des ARS2 TA VH+CH 343-466 IgG mit Sma1 aufgetragen. Bei der Laufspur elf, 13 und 14 ist eine Bande in Höhe von circa 450 bp zu sehen; bei den restlichen sind andere Banden zu sehen. Einer der Klone mit einer 450 bp Bande wurde angeimpft. In den Slots 15 bis 18 sind der Reihe nach, die Kontrollen des Vektors ARS2 TA VL 343-466 IgG mit Sma1 (zuerst ohne dann mit Eco47 3 Reaktion), sowie des Vektors ARS2 TA VH+CH 343-466 IgG mit Sma1 (zuerst ohne, dann mit Eco47 3 Reaktion) aufgetragen. Bei den Kontrollen ohne Enzymreaktion ist eine 450 bp Bande, bei denen mit Enzymreaktion eine 300 bp Bande, sowie eine 200 bp Bande zu erkennen.

Aus der Gelelektrophorese wurde ersichtlich, dass sieben Mutagenesen der VL TA Klone, sowie drei Mutagenesen der VH+CH TA Klone, funktioniert hatten. Es wurde jeweils ein Klon für jeden Vektor in vier ml LB-Amp-Medium angeimpft. Im Anschluss wurde die DNA dann mittels Minipräparation isoliert:

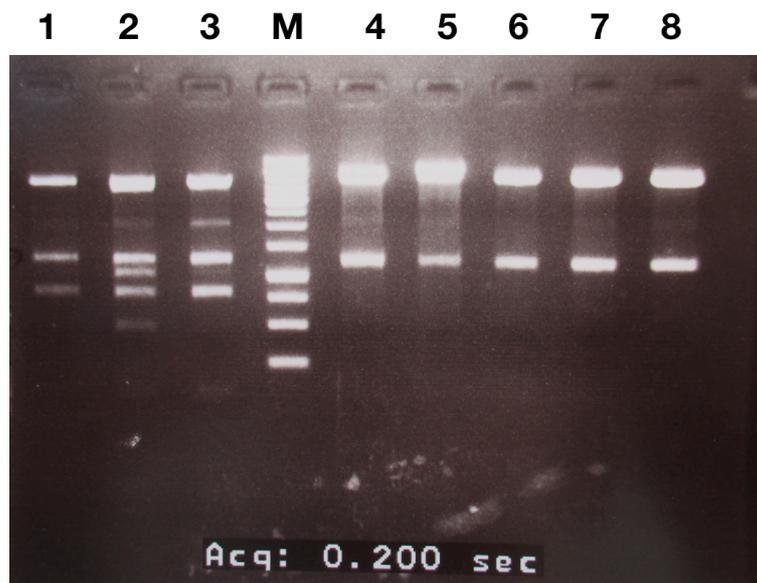
Name
ARS2 TA VL 343-466 IgG mut Sma1/Eco47 3
ARS2 TA VH+CH 343-466 IgG mut Sma1/Eco47 3

**Tabelle 28: BAR-Antikörper Eco 47 3 Mutagenesen**

### Mutagenese des Zielvektors

Da in dem IgG TA Vektor (Zielvektor), abgesehen von der Apa1 Schnittstelle am 3'-Ende der Schwerkette, noch eine weitere Apa1 Schnittstelle vorkommt, musste auch diese mittels Mutagenese

eliminiert werden. Als Ausgangsvektor diente wie gesagt der IgG TA Vektor. Es wurde wie in 3.2.7.7 beschrieben verfahren. Die zwei verwendeten Primer waren TA mut Apa1-s und TA mut Apa1-as. Die Elongationszeit betrug zehn Minuten. Es wurde anschließend in DH 5 alpha Bakterien mit Zwischenkultur transformiert und auf LB-Amp-Agar ausplattiert. Nachdem Kolonien gewachsen waren, wurden fünf dieser Kolonien in vier ml LB-Amp-Medium angeimpft. Nach Isolation der DNA mittels Minipräparation, wurden jeweils 50 ng der selbigen mit Apa1 und BstE2 zur Kontrolle reagieren gelassen (Methode siehe. 3.2.7.2) und anschließend auf einem einprozentigem Agarosegel zusammen mit dem 1 kbp Längenmarker aufgetragen.



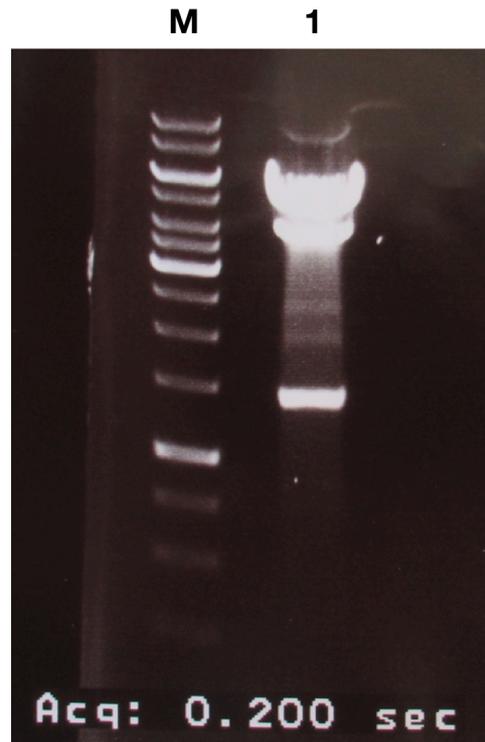
**Abbildung 48: Agarosgel der Reaktion des IgG TA mut Apa1 Vektors mit Apa1 und BstE2**  
Mittig ist der 1 kbp Längenmarker aufgetragen (M). In den Laufspuren vier bis acht sind fünf Klone des IgG TA mut Apa1 Vektors aufgetragen. Bei allen fünf ist eine Bande auf Höhe von circa 1200 bp zu sehen.

Da bei allen fünf Vektoren jeweils nur eine Bande zu sehen war, war davon auszugehen, dass die Mutagenese erfolgreich war, da es bei zwei Apa1 Schnittstellen auch zu zwei Banden gekommen wäre. Mit einem der genetisch identischen fünf Vektoren wurde dann im Folgenden weitergearbeitet. Er wird im Folgenden IgG TA mut Apa1 genannt.

#### 4.4.2.3 Klonierung der Schwereketten

Wie in 4.4 (Vorgehensweise) schon beschrieben, bestand die eigentliche Klonierung aus drei Schritten. In einem ersten Schritt wurde die Schwereketten als Ganzes, also mit ARS2 Sequenz als Äquivalent für die variable Domäne sowie mit den konstanten Domänen 1 bis 3, mit Hilfe von Mun1 und Apa1 kloniert. Bei dem verwendeten Zielvektor handelte es sich um den zuvor bereits mutagenisierten IgG TA mut Apa1 Vektor.

Zunächst wurden also der Zielvektor IgG TA mit Apa1 sowie der TA Vektor mit enthaltener Schwerekettensequenz ARS2 TA VH+CH 343-466 IgG mit Sma1/Eco47 3 jeweils mit Mun1 und Apa1 geschnitten. Es wurden jeweils 2 µg unter Zuhilfenahme des Buffer Blue geschnitten. Der Vektor wurde mittels FastAP auf die Ligation vorbereitet. Die Insert-DNA wurde zusammen mit dem 1 kbp Längenmarker über ein einprozentiges Agarosegel aufgetrennt, ausgeschnitten und anschließend isoliert.

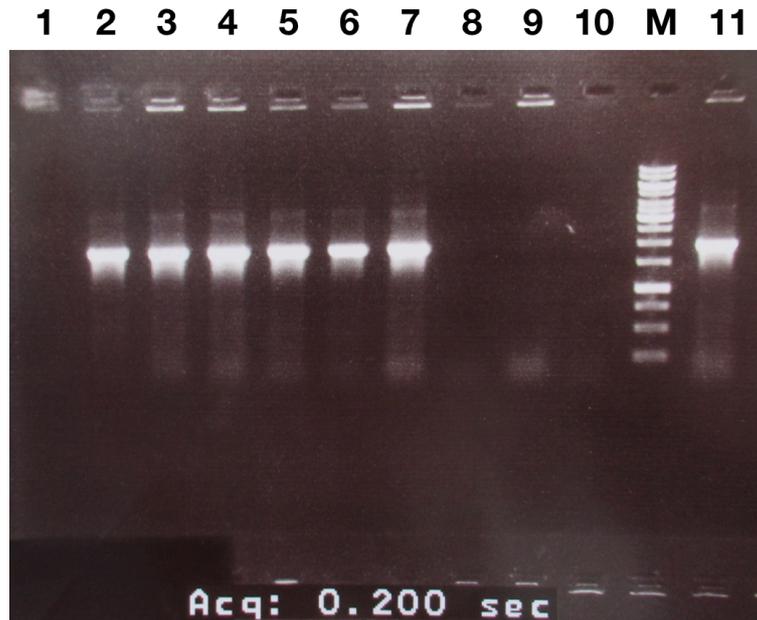


**Abbildung 49: Agarosegel der mit Mun1 und Apa1 geschnittenen Insert-DNA ARS2 TA VH+CH 343-466 IgG Sma1/Eco47 3**

Links ist der 1 kbp Längenmarker aufgetragen (M). Rechts ist der geschnittene Vektor aufgetragen (1). Auf einer Höhe von circa 1500 bp ist eine Bande zu erkennen. Diese Bande wurde später ausgeschnitten und isoliert.

Im Anschluss wurden der geschnittene Vektor und die Insert-DNA miteinander ligiert. Transformiert wurde mit Zwischenkultur in DH 5 alpha Bakterien. Nach der Transformation wurde auf LB-Amp-Agar ausplattiert.

Zur Kontrolle wurde eine Kolonien PCR mit den Primern ARS2 AA343 Mun1-s und kappa-as durchgeführt.



**Abbildung 50: Agarosegel der Kolonien PCR zur Kontrolle der Klonierung der Schwereketten des IgG Konstruktes**  
 Rechts ist der 1 kbp Längenmarker aufgetragen (M). In den Laufspuren der Slots zwei bis sieben ist jeweils bei circa 1800 bp eine Bande zu erkennen.

Es wurde ein Klon in vier ml LB-Amp-Medium angeimpft. Nach Mini- und anschließender Midipäparation wurde die gewonnene DNA mit Hilfe der Primer M13 forward und M13 reverse sequenziert. Die Richtigkeit des Klons konnte durch die Sequenzierung bestätigt werden.

Name
ARS2 TA IgG + Heavy

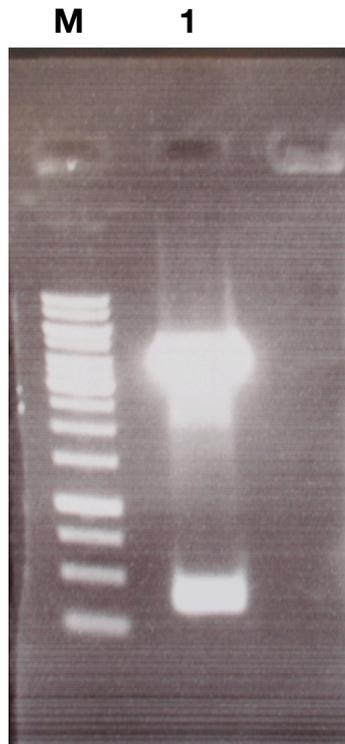
**Tabelle 29: BAR-Antikörper Schwereketten-Klonierung**

#### 4.4.2.4 Klonierung der Leichtkette

Nachdem nun die komplette Schwereketten (variable und konstante Domäne) bereits Bestandteil des IgG TA Vektors waren, wurde nun im zweiten Klonierungsschritt die Leichtkette kloniert.

Dazu ließ man den Vektor ARS2 TA IgG + Heavy zunächst mit den Enzymen AgeI und SmaI und dem Buffer AarI-AjiI-Bpu10I-ScaI-PasI (10x) reagieren. Es wurden zwei µg der DNA zur Reaktion benutzt. Bei SmaI handelt es sich um ein blunt Enzym. Für das Insert ließ man den Vektor ARS2 TA VL 343-466 IgG mit SmaI/Eco47 3 mit den Enzymen AgeI und NruI mit Hilfe des Buffer O reagieren. Es wurden auch hier zwei µg zur Reaktion verwendet. Bei NruI handelt es sich ebenfalls um ein blunt Enzym.

Die Vektor-DNA wurde mit Hilfe der FastAP auf die Ligation vorbereitet. Die Insert-DNA wurde zusammen mit dem 1 kbp Längenmarker auf einem einprozentigem Agarosegel aufgetrennt.

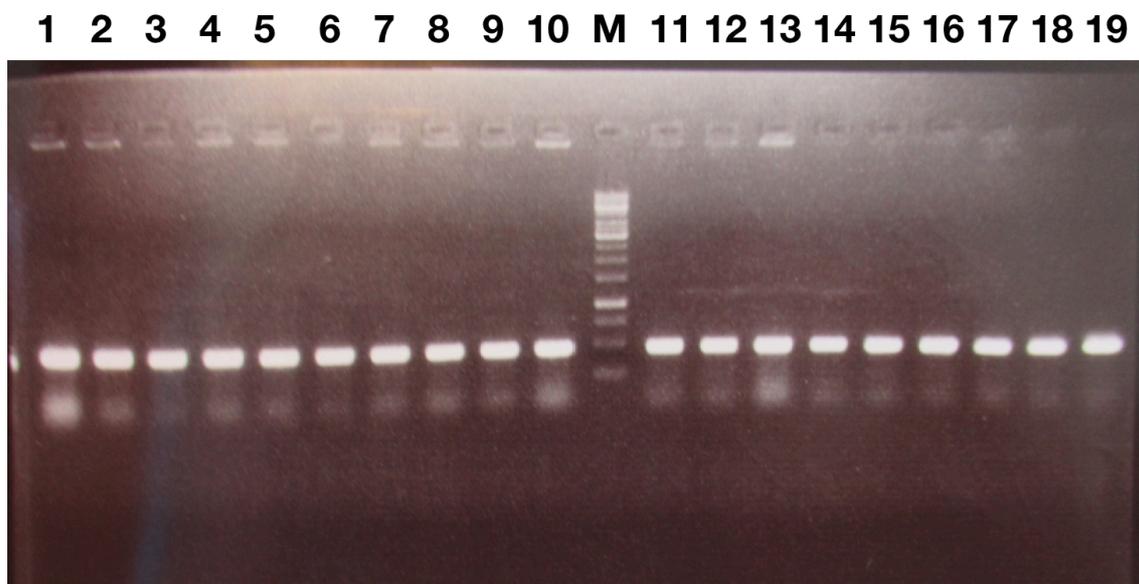


**Abbildung 51: Agarosegel des mit Age1 und Nru1 geschnittenen Vektors ARS2 TA VL 343-466 IgG mut Sma1 / Eco47 3**

Links ist der 1 kbp Längenmarker aufgetragen (M). In der Laufspur eins ist circa auf der Höhe von 350 bp eine Bande zu erkennen. Diese Bande wurde anschließend als Insert-DNA ausgeschnitten.

Anschließend wurde mit der Ligation fortgefahren. Transformiert wurde mit Zwischenkultur in DH 5 alpha Bakterien. Ausplattiert wurde auf LB-Amp-Agar.

Zur Kontrolle wurde im Anschluss eine Kolonien-PCR mit den Primern ARS2 AA 343 Age1-s und kappa-as durchgeführt.



**Abbildung 52: Agarosegel der Kolonien PCR zur Kontrolle der Klonierung der Leichtkette des IgG Konstruktes**  
 In der Mitte ist der 1 kbp Längenmarker aufgetragen (M). In den zehn Laufspuren links des Längenmarkers sowie in den neun Laufspuren rechts des Längenmarker ist jeweils auf einer Höhe von circa 450 bp eine Bande zu sehen.

Es wurde ein Klon in vier ml LB-Amp-Medium angeimpft. Nach Mini- und anschließender Midipräparation wurde die DNA mit Hilfe des Primers kappa-as sequenziert. Auch hier konnte die genetische Korrektheit des Klons mit der Sequenzierung bestätigt werden.

<b>Name</b>
ARS2 TA IgG complete

**Tabelle 30: BAR-Antikörper Leichtketten-Klonierung**

#### 4.4.2.5 pSfi-FLAG Klonierung

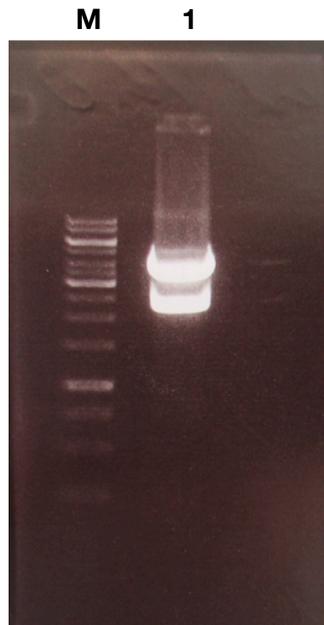
Nachdem nun der Vektor prinzipiell fertig kloniert war, musste die IgG Sequenz nun im dritten Klonierungsschritt als Ganzes (variable und konstante Domänen der Schwer- und Leichtkette) in einen neuen Vektor kloniert werden, um anschließend in HEK-293T Zellen exprimiert werden zu können. Hierbei handelte es sich um den pSfi-FLAG Vektor.

Dazu wurde der pSfi-FLAG Vektor zunächst mit EcoR 5 geschnitten. Bei der Reaktion wurden zwei µg DNA und der Buffer R verwendet.

Der Vektor ARS2 TA IgG complete wurde mit Eco7 3 geschnitten. Bei der Reaktion wurden ebenfalls zwei µg DNA und der Buffer O verwendet.

Bei EcoR 5 sowie Eco7 3 handelt es sich jeweils um blunt Enzyme, sodass später ligiert werden konnte, ohne vorher weitere Modifikationen durchzuführen.

Die Vektor-DNA wurde dann mit Hilfe der FastAP auf die Ligation vorbereitet. Die Insert-DNA wurde zusammen mit dem 1 kbp Längenmarker auf einem einprozentigem Agarosegel aufgetrennt.

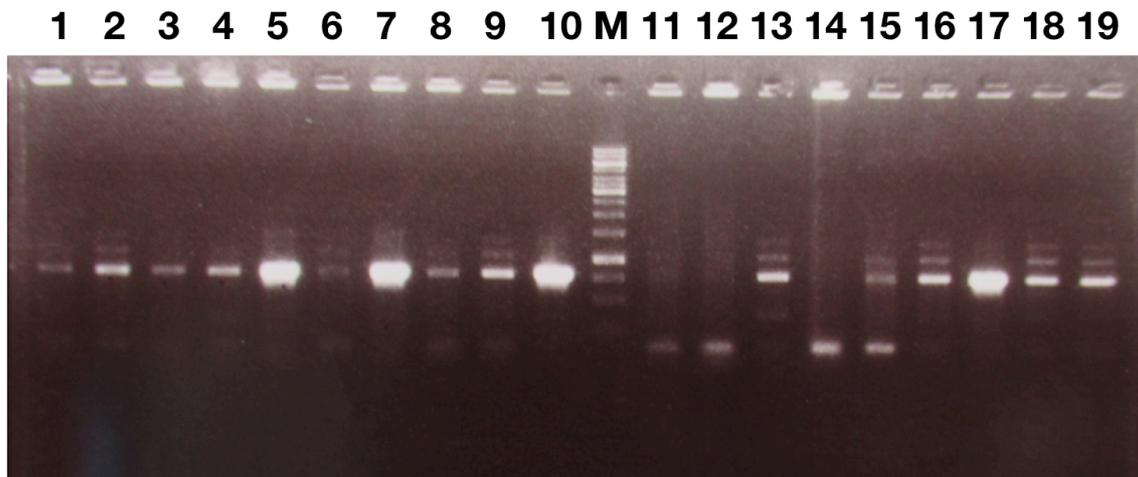


**Abbildung 53: Agarosegel des mit Eco47 3 geschnittenen Vektors ARS2 TA IgG complete**

Links ist der 1 kbp Längenmarker aufgetragen (M). In dem rechts davon gelegenen Slot (1) wurde der Vektor ARS2 TA IgG complete aufgetragen. In der Laufspur auf Höhe von circa 2200 bp ist eine Bande zu erkennen. Diese wurde anschließend als Insert-DNA ausgeschnitten.

Nachdem die Insert-DNA isoliert worden war, wurde selbige mit der Vektor-DNA ligiert. Transformiert wurde mit Zwischenkultur in DH 5 alpha Bakterien. Ausplattiert wurde auf LB-Kan-Agar, da der pSfi-FLAG Vektor eine Kanamycin Resistenz besitzt.

Zur Kontrolle der Ligation wurde eine Kolonien-PCR mit den beiden Primern CMV-Prim und CH1-3' durchgeführt.



**Abbildung 54: Agarosegel der Kolonien PCR zur Kontrolle der pSfi-FLAG Klonierung des IgG Konstruktes**  
 In der Mitte ist der 1 kbp Längenmarker aufgetragen (M). In den Laufspuren der Slots eins bis zehn ist jeweils auf Höhe von circa 750 bp eine Bande zu erkennen. Die Klone der Proben fünf, sieben, zehn und 17 wurden später angeimpft.

Es wurden vier Klone in jeweils vier ml LB-Kan-Medium angeimpft. Anschließend wurde die DNA mittels Minipräparation isoliert.

Name
ARS2 IgG psfi FLAG 1
ARS2 IgG psfi FLAG 2
ARS2 IgG psfi FLAG 3
ARS2 IgG psfi FLAG 4

**Tabelle 31: BAR-Antikörper Klone**

### 4.4.3 Transfektion des BAR Antikörpers

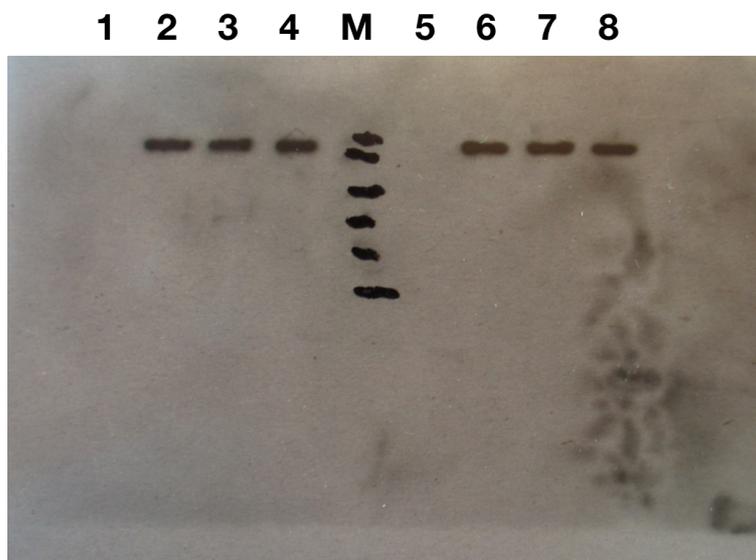
Da es sich bei dem IgG Antikörper um ein komplexeres Konstrukt handelt, kommen Bakterien zur Produktion nicht in Frage. Daher wurde zur Produktion auf HEK-293T Zellen zurückgegriffen. Im Gegensatz zu den bisherigen Konstrukten musste nach erfolgreicher Transfektion nicht mehr wie bei den Bakterien induziert werden.

In einem ersten Schritt wurde also die DNA der vier genetisch identischen Vektoren aus der vorherigen Klonierung (ARS2 IgG psfi FLAG 1 bis 4) jeweils in HEK-293T Zellen transfeziert. Als positiv Kontrolle wurde zusätzlich in einem eigenen Well der Vektor pEGFP-C1 transfeziert.

Nach 48 Stunden Inkubation konnte unter dem Fluoreszenzmikroskop die erfolgreiche Transfektion des pEGFP-C1 Vektors nachgewiesen werden.

## Nachweis der Transfektion

Um nun auch zu belegen, dass die Konstrukte erfolgreich transfeziert worden sind, wurde zunächst von jeder der vier Zell Kulturen eine Zell-Überstand-Suspension sowie ein Teil des reinen Überstands abgenommen. Die insgesamt acht Proben wurden nun mit Hilfe eines zehnpromzentigen SDS-Polyacrylamidgels zusammen mit dem SDS-PAGE Längenmarker ihrer Größe nach aufgetrennt. Nachdem das Gel auf eine PVDF Membran geblottet worden war, wurde die Membran einer Immunfärbung unterzogen. Als primärer Antikörper wurde aufgrund des FLAG-Tags der Monoclonal ANTI-FLAG® M2 antibody produced in mouse von Merck (Karlsruhe, D) verwendet. Danach wurde die Membran auf einem Hyperfilm abgebildet.



**Abbildung 55: Hyperfilm der Western Blot Analyse aus dem Überstand sowie der Zell-Überstand-Suspension der Konstrukte ARS2 IgG 1 bis 4 zum Nachweis der Transfektion**

In der Mitte ist der SDS Gelmarker mit Stift nachgefahren (M). In den Laufspuren eins bis vier links des Marker's wurden der Reihe nach die Überstände der Konstrukte ARS2 IgG 1 bis 4 aufgetragen. In den Laufspuren fünf bis acht wurden der Reihe nach die Zell-Überstand-Suspensionen der Konstrukte ARS2 IgG 1 bis 4 aufgetragen. Bei den Laufspuren der Überstände zwei, drei und vier sowie bei den Zell-Überstand-Suspensionen sechs, sieben und acht ist jeweils auf Höhe von circa 150 kDa eine Bande zu erkennen.

Aus der Analyse wurde ersichtlich, dass 48 Stunden nach der Transfektion die Proteinexpression der Klone ARS2 IgG 2, 3 und 4 erfolgreich war und die Zellen die Konstrukte außerdem in ihren Überstand sezerniert haben. Dieser Schluss konnte gefasst werden, da die durch die Sequenzlänge vorgegebene und zu erwartende Größe der Konstrukte mit der durch die Lauflänge im Western Blot wiedergespiegelten, tatsächlichen Größe übereinstimmte. Und das sowohl in der Analyse des Überstands als auch in der Analyse der Zell-Überstand-Suspension. Das Konstrukt ARS2 IgG 1 konnte nicht nachgewiesen werden, weder intrazellulär noch im Überstand.

#### **4.4.4 Kultivierung der Zellen und Produktion des BAR Antikörpers**

Nachdem die Transfektion bei drei der vier Konstrukte erfolgreich vonstattenging, wurde mit der Selektionierung der Zellen begonnen. Trotz fehlendem Nachweis der erfolgreichen Transfektion wurde auch mit ARS2 IgG 1 weitergearbeitet. Dem Zellmedium wurde nun also G-418 (Geneticin) in einer Konzentration von 500 µg/ml zugegeben. Nur Zellen, die den transfezierten pSfi-FLAG Vektor mitsamt des IgG Konstruktes besitzen, können die durch den Vektor gegebene Resistenz gegen G-418 aufbauen und somit überleben. Das Medium wurde regelmäßig erneuert und die Zellen in immer größere TC-Flaschen überführt. Nachdem sich der Zell-Überstand in jeder TC-Flasche schließlich auf circa 50 ml belaufen hatte, wurden die semi-adhären Zellen und ihr Überstand in den Kulturflaschen durch Schütteln zunächst wieder in eine Suspension überführt. Mit den 50 ml wurde dann folgendermaßen weitergearbeitet:

- Ein ml wurde zur weiteren Kultivierung in einer neuen Kulturflasche mit frischem Medium verwendet.
- Ein ml wurde zum Nachweis der fortbestehenden IgG Produktion für eine Western Blot Analyse verwendet (siehe unten).
- Die restlichen circa 50 ml wurden zehn Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. Der Überstand, indem sich das Konstrukt befinden sollte, wurde dann später zur Isolation und Gewinnung des IgG Konstruktes herangezogen und bis dahin weggefroren (siehe 4.4.5).

#### **Nachweis der Produktion des BAR Antikörpers**

Um nachzuweisen, dass das Konstrukt nach Wochen immer noch von den Zellen produziert wird, wurde eine weitere Western Blot Analyse durchgeführt. Der oben beschriebene eine ml der Suspension aus Zellen und Überstand wurde zunächst mittels Zentrifuge (eine Minute bei 1300 rpm) in Zellen und Überstand aufgetrennt. Der Überstand wurde separiert und direkt mit Probenpuffer versehen. Die Zellen wurden mit PBS pH 7 gewaschen und resuspendiert, bevor sie mit Probenpuffer versehen worden sind. Überstand sowie Zellen wurden dann zusammen mit einem Längenmarker auf einem zehnpromtgem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach dem Blotten auf PVDF-Membran wurde für die Immunfärbung der primäre Antikörper Monoclonal ANTI-FLAG® M2 antibody produced in mouse von Merck (Karlsruhe, D) verwendet. Danach wurde die Membran auf einem Hyperfilm abgebildet.



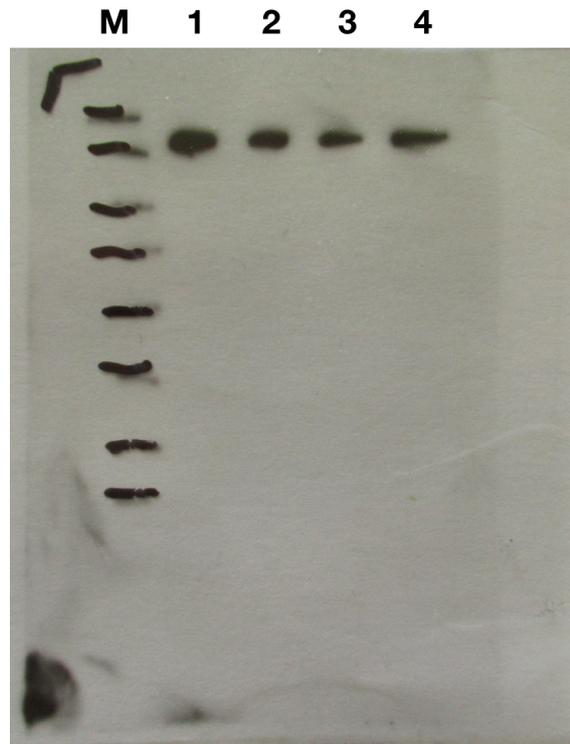
**Abbildung 56: Hyperfilm der Western Blot Analyse aus dem Überstand sowie den Zellen der Konstrukte ARS2 IgG 1 bis 4 zum Nachweis der andauernden Produktion**

In der Mitte ist der SDS Gelmarker mit Stift nachgefahren (M). In den fünf Laufspuren links des Markers wurden die Überstände der Konstrukte ARS2 IgG 1 bis 4 aufgetragen. In den Spuren eins und zwei befindet sich das Konstrukt ARS2 IgG 1, in Spur drei ARS2 IgG2, in Spur vier ARS2 IgG3 und in Spur fünf ARS2 IgG4. In den Laufspuren sechs bis neun wurden der Reihe nach, die Zellen der Konstrukte ARS2 IgG 1 bis 4 aufgetragen. Bei allen Laufspuren ist auf Höhe von circa 150 kDa eine Bande zu erkennen.

Die Western Blot Analyse konnte erneut bestätigen, dass alle vier Zellkulturen das jeweilige ARS2 IgG Konstrukt weiterhin als Protein produzierten und auch in den Überstand sezernierten. Dieser Schluss konnte abermals durch die Übereinstimmung der zu erwarteten Größe mit der tatsächlichen Größe gefasst werden. Außerdem konnte diesmal auch gezeigt werden, dass zu dem aktuellen Zeitpunkt ebenfalls die Zellkultur mit ARS2 IgG1 produktiv war und somit das Konstrukt als Protein exprimierte und in den Überstand sezernierte, was zunächst nach der Transfektion nicht gezeigt werden konnte (siehe 4.4.3).

#### 4.4.5 Proteinisolation

Die 50 ml Zellüberstand (siehe 4.4.4), in denen sich das Konstrukt befinden sollte, wurden mit der zuvor vorbereiteten Anti-FLAG Matrix isoliert. Im Anschluss wurden dann jeweils zehn µl der isolierten Konstrukte auf einem zehnprozentigem SDS-Polyacrylamidgel zusammen mit dem SDS-PAGE-Marker aufgetrennt. Nachdem das Gel dann auf eine PVDF-Membran geblottet wurde, wurde selbige einer Immunfärbung unterzogen. Als primärer Antikörper wurde der Monoclonal ANTI-FLAG® M2 antibody produced in mouse von Merck (Karlsruhe, D) verwendet. Der Blot wurde im Anschluss auf einem Hyperfilm abgebildet.



**Abbildung 50: Hyperfilm der Western Blot Analyse der Konstrukte ARS2 IgG 1 bis 4 zum Nachweis der erfolgreichen Isolation**

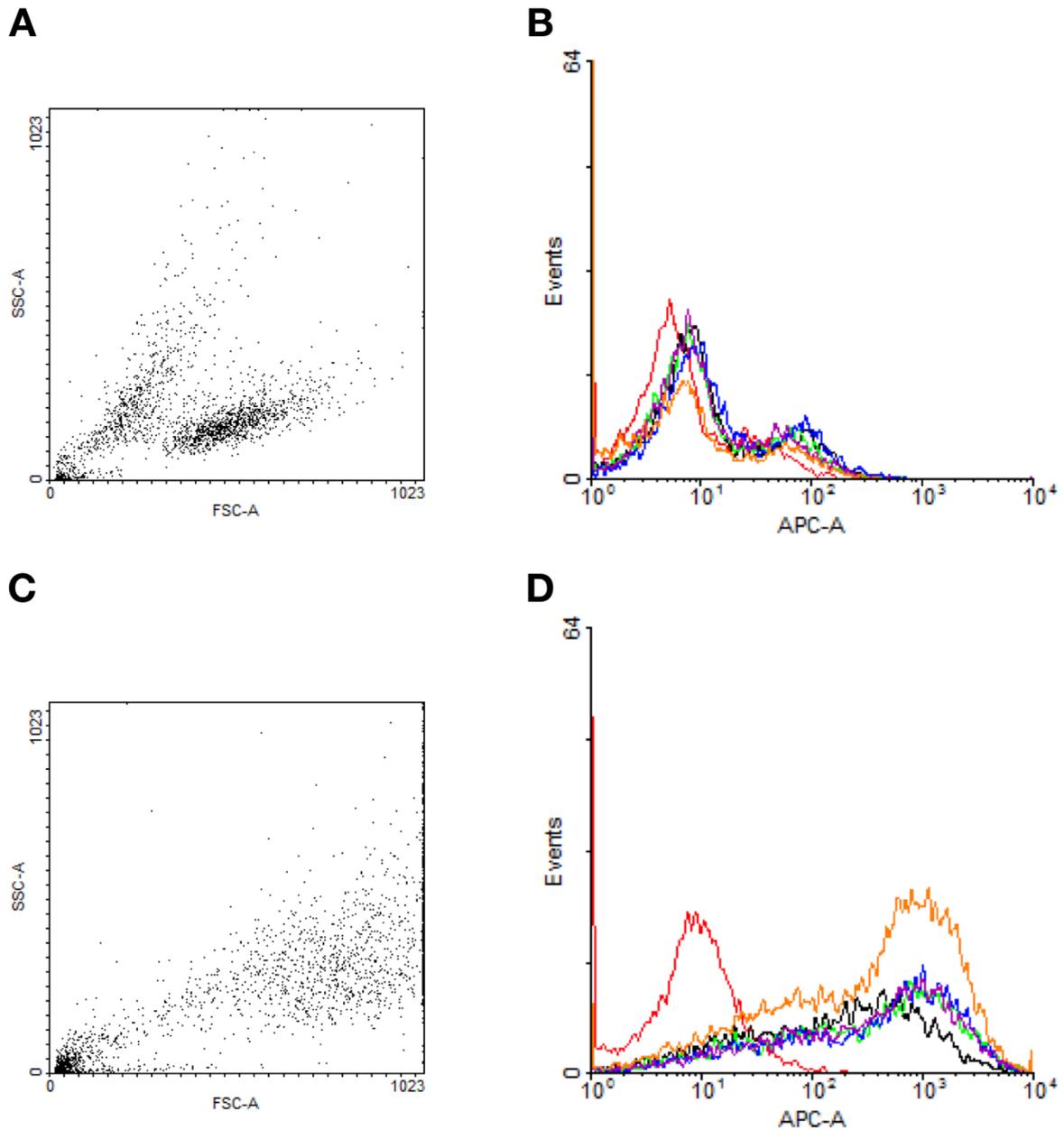
Links wurde der SDS-PAGE Längenmarker mit Stift nachgefahren (M). In den Spuren zwei bis fünf wurden der Reihe nach die isolierten Konstrukte ARS2 IgG 1 bis 4 aufgetragen. Bei allen ist eine Bande auf Höhe von circa 150 kDa zu erkennen.

Auch nach der Proteinisolation konnte durch den Western Blot erfolgreich, wie schon zuvor, das Vorhandensein der vier ARS2 BAR Antikörper als Protein bestätigt werden.

#### **4.4.6 Oberflächenfärbung zur Kontrolle der Bindung**

Nun musste überprüft werden, ob die vier genetisch identischen Antikörper Konstrukte auch auf der ARS2 positiven U2932 Zelllinie binden. Die Analyse wurde demnach mit den Konstrukten ARS2 IgG 1 bis 4, sowie der positiv Kontrolle ARS2 (ARS2-Protein an FLAG-Tag gekoppelt) (laborinterne Kontrolle) durchgeführt. Es wurde zum einen auf der ARS2 positiven Zelllinie U2932 getestet, als auch auf der ARS2 negativen Zelllinie TMD8. Es wurde bei Raumtemperatur 20 Minuten inkubiert.

Als primärer Antikörper wurde auf Grund des FLAG-Tags der Monoclonal ANTI-FLAG® M2 antibody produced in mouse von Merck (Karlsruhe, D) verwendet. Des Weiteren wurde der Anti-IgG1-APC, mouse von Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D) als sekundärer Antikörper, sowie als Farbstoff, verwendet.

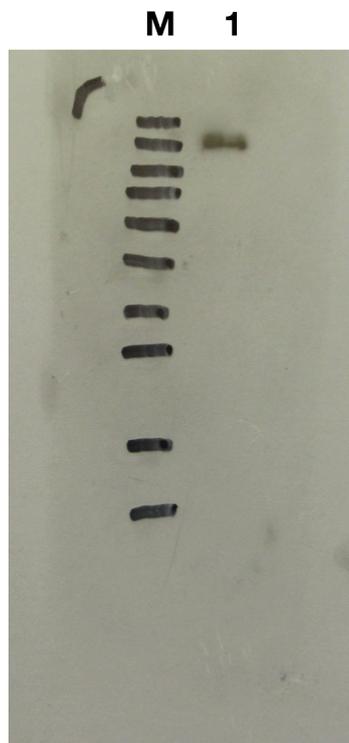


**Abbildung 51: Dotplots und Histogramme der Oberflächenfärbung der TMD 8, sowie U2932 Zelllinie nach 20 Minuten Inkubation mit den Konstrukten ARS2 Ig 1 bis 4 und der positiv Kontrolle ARS2 bei Raumtemperatur**  
**A: Dotplot TMD8 Zelllinie** Auf der Abszisse ist der forward scatter (FSC-A), auf der Ordinate der sideward scatter (SSC-A), aufgetragen.  
**B: Histogramm TMD8 Zelllinie** Auf der Abszisse ist die Emission des Allophycocyanin Farbstoffes (APC-A) aufgetragen. Auf der Ordinate sind die Events aufgetragen. Die rote Kurve spiegelt den Leerwert wider. Die schwarze Kurve steht für die positiv Kontrolle ARS2. ARS2 IgG1 wird durch die grüne Kurve, ARS2 IgG2 durch die blaue Kurve, ARS2 Ig3 durch die lila Kurve und ARS2 IgG4 durch die orangene Kurve repräsentiert.  
**C: Dotplot U2932 Zelllinie** Auf der Abszisse ist der forward scatter (FSC-A), auf der Ordinate der sideward scatter (SSC-A), aufgetragen.  
**D: Histogramm U2932 Zelllinie** Auf der Abszisse ist die Emission des Allophycocyanin Farbstoffes (APC-A) aufgetragen. Auf der Ordinate sind die Events aufgetragen. Die rote Kurve spiegelt den Leerwert wider. Die schwarze Kurve steht für die positiv Kontrolle ARS2. ARS2 IgG1 wird durch die grüne Kurve, ARS2 IgG2 durch die blaue Kurve, ARS2 Ig3 durch die lila Kurve und ARS2 IgG4 durch die orangene Kurve repräsentiert.

Durch die Analysen konnte schlussendlich gezeigt werden, dass die vier genetisch identischen ARS2 BAR Antikörper alle spezifisch auf ARS2 positiven Zellen (hier die U2932 Zelllinie) binden. Auf ARS2 negativen Zellen (hier TMD8) kommt es zu keiner Bindung.

#### 4.4.7 Proteinanreicherung und Isolation

Um mit den ARS2 BAR Antikörpern nun weitere Experimente durchführen zu können, war es zunächst nötig die Proteinmenge zu vergrößern. Die Zellen, die das Konstrukt produzieren, wurden so lange weiter kultiviert, bis es möglich war einen Überstand von insgesamt 500 ml zu sammeln. Dabei wurden die Überstände der vier Zellreihen zusammen verwendet, da es sich um genetisch identische Konstrukte handelt und auch alle zuvor erfolgreich gebunden hatten. Die 500 ml Überstand wurden nun, wie in 3.2.9.9 im Methodenteil beschrieben, auf ein Volumen von circa 50 ml konzentriert. Nun wurde erneut das Protein mit der vorbereiteten Anti-FLAG Matrix isoliert. Anschließend wurden dann fünf  $\mu\text{l}$  des isolierten Proteins mit dem SDS-PAGE-Marker auf einem zehnprozentigem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach dem Blotten auf eine PVDF-Membran wurde eine Immunfärbung mit dem Monoclonal ANTI-FLAG® M2 antibody produced in mouse von Merck (Karlsruhe, D) als primärem Antikörper durchgeführt. Der Blot wurde auf einem Hyperfilm abgebildet.



**Abbildung 52: Hyperfilm der Western Blot Analyse des ARS2 IgG Konstruktes zum Nachweis der erfolgreichen Isolation**

Links wurde der SDS-PAGE Längenmarker mit Stift nachgefahren (M). In der Spur eins wurde das isolierte Konstrukt ARS2 IgG aufgetragen. Es ist eine Bande auf Höhe von circa 150 kDa zu sehen.

Mit Hilfe des Blots konnte nochmals bestätigt werden, dass nach der Proteinisolation das Konstrukt nach wie vor als Protein vorliegt. Das lässt sich durch die Bande auf der Höhe der zu erwarteten Größe des Antikörpers schlussfolgern. Die anschließende photometrische Analyse ergab eine Proteinkonzentration von 843 µg/ml.

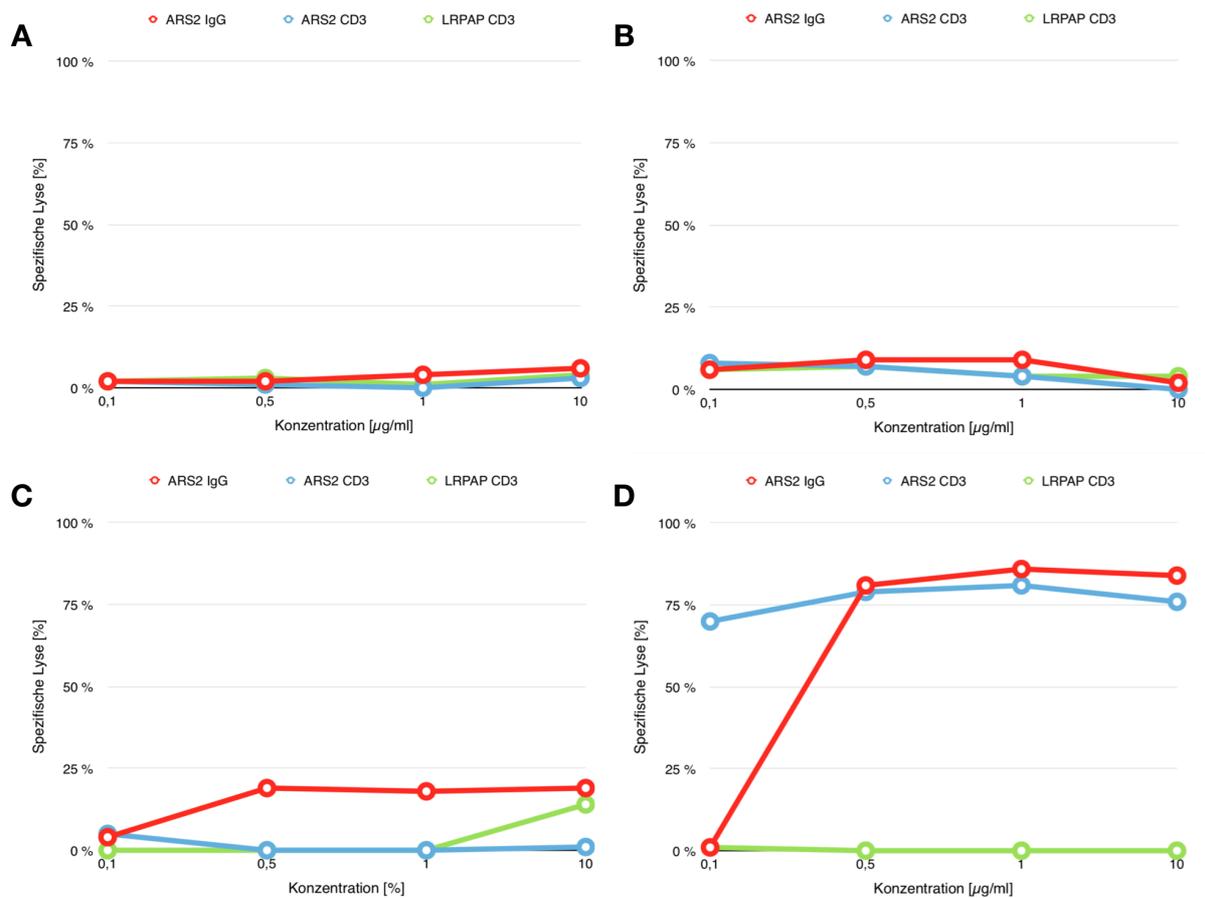
#### **4.4.8 Zytotoxizitätsassay**

Nachdem erfolgreich die Bindung auf der U2932 Zelllinie gezeigt werden konnte und ausreichend Konstrukt angereichert werden konnte, galt es nun zu überprüfen, ob der ARS2 BAR Antikörper auch zytotoxisch auf die Zellen wirkt.

Da es sich bei dem Konstrukt um einen IgG1 Antikörper handelt wurde davon ausgegangen, dass für die maximale Ausschöpfung der zytotoxischen Möglichkeiten Effektorzellen nötig waren. Der Antikörper wirkt opsonierend und bringt infolgedessen Effektorzellen dazu die Targetzellen, in diesem Fall die U2932 Zellen, zu lysieren. Als Effektorzellen wurden vorher aus EDTA-Blut isolierte PBMCs verwendet.

Es wurden mehrere Tests durchgeführt, bei denen der Antikörper jeweils für vier Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubierte. Die getesteten Konzentrationen reichten von 10 µg/ml über 1 µg/ml, 0,5 µg/ml bis zu 0,1 µg/ml.

Es wurde zum einen auf der TMD8 Zelllinie, einer ARS2 negativen Zelllinie, jeweils einmal mit und einmal ohne PBMCs getestet. Des Weiteren wurde auch auf der U2932 Zelllinie, einer ARS2 positiven Zelllinie, jeweils einmal mit und einmal ohne PBMCs getestet. Als positiv Kontrolle wurden das bispezifische Konstrukt ARS2-CD3 verwendet (laborinterne Kontrolle). Als negativ Kontrolle diente das bispezifische Konstrukt LRPAP-CD3 (laborinterne Kontrolle).



**Abbildung 53: Analyse des LDH Zytotoxizitätsassays des ARS2 IgG Konstruktes auf der TMD8 Zelllinie, sowie der U2932 Zelllinie jeweils ohne und mit PBMC's nach vier Stunden Inkubation**

**A: TMD8 Ziellinie ohne PBMC's** Auf der Abszisse ist die verwendete Konzentration der Konstrukte in  $\mu\text{g/ml}$  aufgetragen. Die Ordinate zeigt die spezifische Lyse. Die rote Kurve zeigt das Konstrukt ARS2 IgG. Die blaue Kurve zeigt das Konstrukt ARS2 CD3. Die grüne Kurve zeigt das Konstrukt LRPAP CD3.

**B: TMD8 Ziellinie mit PBMC's** Auf der Abszisse ist die verwendete Konzentration der Konstrukte in  $\mu\text{g/ml}$  aufgetragen. Die Ordinate zeigt die spezifische Lyse. Die rote Kurve zeigt das Konstrukt ARS2 IgG. Die blaue Kurve zeigt das Konstrukt ARS2 CD3. Die grüne Kurve zeigt das Konstrukt LRPAP CD3.

**C: U2932 Ziellinie ohne PBMC's** Auf der Abszisse ist die verwendete Konzentration der Konstrukte in  $\mu\text{g/ml}$  aufgetragen. Die Ordinate zeigt die spezifische Lyse. Die rote Kurve zeigt das Konstrukt ARS2 IgG. Die blaue Kurve zeigt das Konstrukt ARS2 CD3. Die grüne Kurve zeigt das Konstrukt LRPAP CD3.

**D: U2932 Ziellinie mit PBMC's** Auf der Abszisse ist die verwendete Konzentration der Konstrukte in  $\mu\text{g/ml}$  aufgetragen. Die Ordinate zeigt die spezifische Lyse. Die rote Kurve zeigt das Konstrukt ARS2 IgG. Die blaue Kurve zeigt das Konstrukt ARS2 CD3. Die grüne Kurve zeigt das Konstrukt LRPAP CD3.

Die Ergebnisse aller vier Assays lassen sich folgendermaßen interpretieren:

Auf der TMD8 Zelllinie kam es weder mit noch ohne PBMCs zu einer bedeutenden Lyse der Zellen. Geschuldet ist dies der Tatsache, dass die Zelllinie ARS2 negativ ist und somit der ARS2 IgG Antikörper gar nicht erst an den B-Zell-Rezeptor der Zellen binden kann. Auch die positiv Kontrolle ARS2 CD3 und die negativ Kontrolle LRPAP CD3 können nicht an die Zellen binden und zytotoxisch wirken.

Auf der U2932 Zelllinie kam es ohne PBMCs zu einer spezifischen Lyse durch den ARS2 IgG Antikörper von maximal 19 % bei einer Konzentration von 0,5  $\mu\text{g/ml}$ .

Zusammen mit den PBMCs kam es durch den ARS2 IgG Antikörper auf der U2932 Zelllinie zu einer hohen spezifischen Lyse, die bei einer Konzentration von 0,5 µg/ml ganzen 81% entsprach. Das Maximum an spezifischer Lyse erreichte der ARS2 IgG Antikörper bei einer Konzentration von 1 µg/ml, nämlich 86 %.

Die positiv Kontrolle ARS2 CD3 führt zu einer ähnlichen spezifischen Lyse mit PBMCs.

## **5. Diskussion**

### **5.1 Interpretation der Ergebnisse**

#### **5.1.1 BAR Fab Konstrukt**

Zu Beginn der Arbeit wurde zunächst mit Hilfe des BAR Fab Konstruktes überprüft, ob es durch die ARS2 Sequenz zu einer spezifischen Bindung an den BCR der U2932 Zelllinie kommen kann. Dazu wurden drei verschiedene Konstrukte mit wiederum drei verschiedenen ARS2 Sequenzen, bei denen sich die Lage des Epitops in Bezug zur restlichen Sequenz unterscheidet, untersucht. Analog zu den drei CDR's eines humanen Immunglobulins mit jeweils unterschiedlicher Lage wurden die ARS2 BAR Fab Konstrukte so konstruiert, dass die jeweilige Lage des Epitops mit der physiologischen Lage einer der CDR's mehr oder weniger übereinstimmt. Aus dem Ergebnis, dass nur eines der drei Konstrukte auf der U2932 Zelllinie gebunden hat (siehe 4.1.4), lässt sich nun ableiten, dass die Lage des ARS2 Epitops innerhalb der ARS2 Sequenz eine wichtige Rolle bei den Mechanismen der Bindung der Konstrukte spielt. Das bindende Konstrukt ARS2 Fab 343-466 zeichnet sich durch die c-terminale Lage des Epitops innerhalb der variablen Domänen aus und war somit mehr oder weniger das Korrelat zur CDR3 eines humanen Immunglobulins.

Es lässt sich nur mutmaßen, weshalb ausgerechnet ausschließlich dieses Konstrukt erfolgreich gebunden hat. Durch die unterschiedliche Lage des Epitops und auch den unterschiedlichen Ausschnitt der verwendeten ARS2 Sequenz kommt es zu verschiedenen Faltungsprozessen und Interaktionen zwischen den einzelnen Aminosäuren und letztendlich auch jeweils zu einer unterschiedlichen dreidimensionalen Struktur des Proteins. Die dreidimensionale Struktur entscheidet dann darüber, ob eine Bindung zustande kommt (wie bei ARS2 BAR-Fab 343-466) oder nicht. Prinzipiell geht man davon aus, dass die dreidimensionale Struktur weitestgehend von der Primärstruktur (Aminosäuresequenz) des Proteins abhängig ist und der Weg zu dieser Struktur über Faltungsprozesse spontan abläuft ohne dass zusätzliche Energie aufgebracht werden muss [11]. Natürlich kann es aber auch in diesen Faltungsprozessen zu Fehlern kommen, was dann zum Beispiel in einer Aggregation der synthetisierten Antikörperfragmente enden kann und letztendlich zur fehlenden Bindung des Konstrukts führen könnte [28,76].

Auf weitere Experimente wie beispielsweise die Überprüfung der Zytotoxizität auf der gebundenen U2932 Zelllinie wurde verzichtet, da das Konstrukt weder das Potenzial zur direkten Zytotoxizität in Form eines Toxins besitzt noch die Möglichkeit zur Rekrutierung von Effektorzellen hat.

### **5.1.2 BAR Fab-ETA Konstrukt**

Es handelt sich bei diesem Konstrukt um ein sogenanntes antibody-drug conjugate (ADC), bei dem ein Antikörper oder ein antikörperähnliches Konstrukt mit einem Toxin gekoppelt wird.

Nach erfolgreicher Bindung dieses Konstrukts auf der U2932 Zelllinie, sollte nun die mögliche Zytotoxizität durch das gekoppelte ETA Toxin überprüft werden. Es konnte in diesem Fall keine Zytotoxizität gezeigt werden. Durch weitere Experimente konnte ebenfalls gezeigt werden, dass der Grund hierfür eine fehlende Internalisierung des Konstrukts war (siehe 4.2).

Die Internalisierung von ADCs ist ein sehr komplexer Vorgang, der von vielen verschiedenen Variablen abhängig ist. Da wären einmal das Epitop, die Anzahl der Bindungspartner des Konstrukts, der Linker und auch andere, auf der Zelle vorzufindende Oberflächenmarker [32].

Wodurch genau es in diesem Experiment zur fehlenden Internalisierung kam, lässt sich ohne weiterführende Untersuchungen zu diesem Zeitpunkt nicht eindeutig sagen.

### **5.1.3 BAR Schwerketten-ETA Konstrukt**

Die BAR Schwerketten-ETA Konstrukte konnten alle erfolgreich von den Zellen internalisiert werden. Wie schon oben beschrieben, handelt es sich bei dem Vorgang der Internalisierung um einen sehr komplexen Vorgang [32]. Aufgrund der Tatsache, dass die BAR Fab-ETA Konstrukte nicht internalisiert worden sind, die BAR Schwerketten Konstrukte jedoch schon, lässt sich vermuten, dass die Ursache die unterschiedliche Größe oder aber die unterschiedliche Valenz der Konstrukte ist. Sicher sagen ließe sich das jedoch nur durch weiterführende Experimente.

Das Ergebnis des Zytotoxizitätsassays des ETA Konstrukts zeigte eine spezifische Lyse von 50% bei 5µg/ml Konstrukt. Demnach führt die erfolgreiche Internalisierung also auch zu der erwünschten Zytotoxizität.

### **5.1.4 BAR Antikörper Konstrukt**

Zunächst konnte auch beim Antikörperkonstrukt die erfolgreiche Bindung gezeigt werden, was durch das unveränderte Epitop auch nicht verwundert. Im Anschluss wurde mit den Zytotoxizitätsassays fortgefahren:

### **TMD8 Zelllinie:**

Die fehlende Lyse auf der TMD8 Zelllinie, sowohl mit als auch ohne PBMCs, lässt sich durch die fehlende Fähigkeit des BCRs der Zelllinie, das ARS2 Antigen zu binden (ARS2 negativ), erklären.

Dadurch kommt es bei keinem der Konstrukte zu einer relevanten Lyse, da die Konstrukte gar nicht erst erfolgreich zu ihrem Wirkort gelangen können.

### **U2932 Zelllinie ohne PBMCs:**

Bei dem Versuchsaufbau mit der U2932 Zelllinie ohne PBMCs zeigt sich mit dem ARS2 IgG Konstrukt eine relevante spezifische Lyse mit einem Maximum von 19% bei einer Konstrukt-Konzentration von 0,5 µg/ml. Dadurch, dass der BCR der U2932 Zelllinie ARS2 bindet, gelangt das Konstrukt also erfolgreich zu den Zellen. Die Beobachtung dieser Lyse kann nicht durch die, für Antikörper typische, ADCC erklärt werden, da hierfür PBMCs als Effektorzellen benötigt würden. Auch die CDC kann die Lyse nicht erklären, da das Medium des Zytotoxizitätsassays keinerlei Komplementfaktoren enthält. Eine mögliche Erklärung für die Lyse sind direkte zytotoxische Effekte der Antikörper auf die B-Zellen, wie zum Beispiel activation-induced cell death in B-lymphocytes (AICD). Hier kommt es durch crosslinking der BCRs auf der Oberfläche der B-Zelle über verschiedene Signalkaskaden zur Induktion der Apoptose. Diese Quervernetzung kann in unserem Experiment durch die Bindung der zwei ARS2 Domänen eines jeden Antikörpers an den BCRs zu Stande kommen [49].

Bei dem LRPAP-CD3 Konstrukt (laborinterne Kontrolle) kommt es zu keiner spezifischen Lyse, was an der fehlenden Bindung der Konstrukte auf den Zellen liegt.

Bei dem ARS2-CD3 Konstrukt kommt es ebenfalls zu keiner spezifischen Lyse. Hier kommt es zwar zu einer Bindung auf der Oberfläche der Zellen über das ARS2-Antigen. Die Wahrscheinlichkeit, mit der in diesem Szenario eine AICD initiiert wird, ist jedoch aufgrund der Monovalenz des ARS2 CD3 Konstrukts (laborinterne Kontrolle) geringer. Es kann ebenfalls nicht zu einer Rekrutierung von Effektorzellen über das CD3 kommen, da keine PBMCs dem Versuchsaufbau zugeführt wurden.

### **U2932 mit PBMCs:**

Bei dem Versuch auf der U2932 Zelllinie mit PBMC's kommt es nun mit dem ARS2 Immunglobulin Konstrukt zu einer spezifischen Lyse von maximal 86% bei einer Konstrukt-Konzentration von 1 µg/ml. Hier kommen nun zum einen die spezifische Bindung des Konstrukts an den Zellen und zum anderen die über den FC-Teil des Antikörpers vermittelte Lyse durch die Effektorzellen (die PBMCs) zusammen. Es kommt hier zur antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC), die aller Wahrscheinlichkeit nach, den größten Teil der hier vollbrachten spezifischen Lyse ausgemacht hat. Auch hier kann es jedoch ebenfalls zusätzlich zu einer AICD durch crosslinking kommen.

Auch bei der positiv Kontrolle ARS2-CD3 kommt es nun auch zu einer Lyse durch erfolgreiche Rekrutierung von Effektorzellen (PBMCs) mit Hilfe des CD3.

Wie oben bereits erwähnt, stellt in diesem Experiment die complement dependent cytotoxicity (CDC), im Gegensatz zur Wirkung der meisten rekombinanten Antikörper im Menschen, durch die fehlenden Komplementfaktoren in dem Medium des Versuchsaufbaus, keinen relevanten Faktor dar [139].

## 5.2 Vergleich verschiedener Konstrukte

### 5.2.1 Pharmakokinetik

#### 5.2.1.1 Elimination

Ein zentraler Punkt der Pharmakokinetik der Konstrukte ist die Elimination. Diese steht wiederum in engem Zusammenhang mit der Konzentration und ebenfalls mit der Halbwertszeit der Konstrukte im menschlichen Körper.

Studien konnten zeigen, dass Fab Konstrukte zu einem großen Teil über die Niere eliminiert werden [144]. Es kommt dadurch zu einer schnellen Elimination aus dem Körper und somit zu einer kurzen Halbwertszeit von Fab Konstrukten. Diese Eigenschaft wird sich therapeutisch hin und wieder bei einigen Fab Konstrukten zu Nutze gemacht. Die Aufgabe dieser als Toxin-Antidot agierenden Konstrukte besteht dann darin, gebundene Toxine schnellstmöglich aus dem Körper zu eliminieren. Als Beispiel lässt sich das Digoxin Fab immune fragment nennen, welches bei Digoxin Intoxikationen zum Einsatz kommt [157].

Generell lässt sich sagen, dass der Anteil eines Moleküls der durch den Glomerulus filtriert und letztendlich dann von der Niere auch ausgeschieden wird von der Größe, der Ladung und der Struktur des Moleküls abhängig ist [173]. Je kleiner ein Molekül, desto größer ist der Anteil des Moleküls der über die Niere ausgeschieden werden kann. So werden auch die sogenannten single-chain variable fragments, kurz scFv (siehe 5.4.1.1), dank ihrer geringen Größe sehr schnell über die Niere aus dem Körper eliminiert [5]. Somit kann auch davon ausgegangen werden, dass die Schwereketten Konstrukte aufgrund ihrer ebenfalls geringen Größe womöglich einer zügigen renalen Elimination unterliegen.

Vollständige Antikörper Moleküle hingegen werden kaum über die Niere ausgeschieden. Sie unterliegen zum Großteil einem intrazellulären Metabolismus. Nachdem sie über den Mechanismus der Endozytose in die Zelle aufgenommen wurden, werden sie lysosomal metabolisiert [175]. Antikörper unterliegen außerdem dem target-mediated drug disposition Modell (TMDD). Dieses besagt, dass es durch die hohe Bindungsaffinität der Antikörper zu ihren Rezeptoren und den damit verbundenen variablen, ortsabhängigen Wirkstoffkonzentrationen und dem variablen Vorhandensein von Wirkstoffkomplexen zu Beeinflussungen der Pharmakokinetik kommt [104].

Es existieren zahlreiche Ansätze, die dazu dienen, die schnelle renale Elimination kleiner Moleküle zu verhindern. Einer dieser Ansätze ist die Kopplung an Polyethylenglycol (PEG), was die Moleküle größer machen soll und dadurch die Filtration im Glomerulus vermindern soll [79]. Auch gibt es Konzepte bei

denen Moleküle spezifisch an Albumin binden, um dadurch auch die Plasmahalbwertszeit zu erhöhen [2]. Humanes Serumalbumin, sowie auch humanes Immunglobulin, sind beide dazu in der Lage den neonatalen Fc-gamma-Rezeptor (FcRn) zu binden. Diese Bindung ermöglicht es beiden Molekülen, einem katabolen Prozess zu entgehen [34,81].

Inwiefern diese Konzepte auf die in dieser Arbeit untersuchten Konstrukte übertragbar wären, müsste im Einzelfall mit passenden Experimenten weiterführend untersucht und erforscht werden. Prinzipiell wären diese Konzepte jedoch durchaus denkbar.

### **5.2.1.2 Gewebepenetration**

Bevor die Antikörperkonstrukte überhaupt wirken können, müssen sie zunächst erstmal erfolgreich an ihren Wirkort gelangen.

In Studien konnte gezeigt werden, dass die scFv (siehe 5.4.1.1) wesentlich besser dazu in der Lage sind, Tumorgewebe zu penetrieren als humane Immunglobuline. Es lässt sich ein Zusammenhang zwischen der Größe von Antikörper oder antikörperähnlichen Konstrukten und der Fähigkeit zur Tumورpenetration herstellen. Je kleiner die Konstrukte, desto besser die Penetration. Zum einen zeigt sich zentral im Tumor zum selben Zeitpunkt bei größeren Konstrukten eine geringere Wirkkonzentration als bei kleineren Konstrukten. Zum anderen stellt sich zentral im Tumorgewebe dieselbe Konstrukt-Konzentration unterschiedlich großer Konstrukte bei den kleineren Konstrukten wesentlich schneller als bei den größeren Konstrukten ein [185].

Übertragen auf die in dieser Arbeit getesteten Konstrukte, lässt sich daraus schlussfolgern, dass das Schwereketten Konstrukt womöglich zu einer wesentlich effektiveren Tumورpenetration als der BAR Antikörper fähig ist. Das BAR Fab Konstrukt wäre irgendwo dazwischen einzuordnen. Jedoch zeigte es auf Grund der fehlenden Internalisierung ohnehin keinerlei zytotoxische Wirkung in dieser Arbeit.

Therapeutisch könnte das relevant werden, wenn im Einzelfall unterschiedlich große Lymphommanifestationen zu betrachten und zu therapieren wären. Der BAR Antikörper benötigte somit für eine ähnliche Konzentration am Wirkort längere Wirkzeiten und höhere initiale Konzentrationsspiegel als das Schwereketten-Konstrukt.

### **5.2.1.3 Aggregation**

Ein zentrales Problem der zahlreichen monoklonalen Antikörper ist, dass sie zur Aggregation neigen [101].

Aber auch andere antikörperähnlichen Konstrukte, wie zum Beispiel die scFv (5.4.1.1.) neigen zur Aggregation [182]. Das Problem der Aggregation betrifft somit also alle Antikörper und antikörperähnlichen Konstrukte. Kommt es zur Aggregation, ist in der Folge die Wirksamkeit der Konstrukte natürlich stark eingeschränkt.

Inwieweit dieses Problem im Einzelfall ausgeprägt ist, ist von zahlreichen unterschiedlichen Faktoren, wie auch der Primärstruktur des Konstrukts, abhängig.

Auch die in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte haben somit Potenzial zu aggregieren. Bei welchem dieser Konstrukte diese Eigenschaft am prominentesten ausgeprägt ist, wäre wiederum im Einzelfall zu untersuchen.

#### **5.2.1.4 Immunisierung**

Das menschliche Immunsystem ist in der Lage, sich gegen eine Vielzahl an Erregern und Noxen zu schützen. Diese Fähigkeiten führen auch dazu, dass Proteine, die in den menschlichen Organismus gelangen, erkannt werden und es darauffolgend zu einer spezifischen Abwehrreaktion kommt. So kommt es auch bei vielen, als therapeutischen Substanzen eingesetzten Proteinen, zu einer Immunisierungsreaktion. Der Körper bildet also selbst Antikörper gegen die jeweilige Substanz. Infolgedessen kann es zu einer Reduzierung des Wirkpotenzials und der Effektivität der Substanzen kommen. Insbesondere bei einer erneuten Applikation des selben Wirkstoffs kann es zu einer Verschlechterung der Wirkung kommen [38].

Die in dieser Arbeit getesteten Konstrukte bieten demnach alle das Potenzial zur Immunisierung. Die Immunogenität einzelner Substanzen hängt von zahlreichen Faktoren, wie der Primärstruktur, aber auch der Dosierung, der Darreichungsform und vielem Weiterem ab [31].

Ein grundlegender Unterschied zwischen in prokaryotischen oder eukaryotischen Expressionssystemen synthetisierten Proteinen, ist die fehlende Glykosylierung der prokaryotisch synthetisierten Proteine. Bei komplexen Proteinen, wie beispielsweise dem BAR-Antikörper, der ohnehin auf die Glykosylierung angewiesen ist, kann es dadurch bei prokaryotischer Expression zu einer gesteigerten Immunogenität kommen [82].

Es besteht die Möglichkeit, vorab das immunogene Potenzial der Substanzen zu testen. Hier gibt es zahlreiche, verschiedene Verfahren. Eins davon sind zum Beispiel ex vivo T-Zell Aktivierungs Tests. Gemessen wird dabei die Zytokinproduktion, die dann im Verhältnis zur Immunogenität der Substanz steht [38].

Interessant wäre das immunogene Potenzial der in dieser Arbeit getesteten Konstrukte insbesondere dann, wenn es zu einer für Medikamente typischen, wiederholten Applikation innerhalb eines bestimmten Intervalls kommt. Um hier dann mögliche Verluste bezüglich der Wirksamkeit vorherzusagen und so die Dosierung und Intervalllänge optimal einstellen zu können, wären weiterführende Experimente von Nöten.

## **5.2.2 Herstellung**

### **5.2.2.1 Fab- und Schwerketten-Konstrukte**

Bei den kleineren Konstrukten, wie in dieser Arbeit den Fab-Konstrukten und den Schwerketten-Konstrukten, besteht die Möglichkeit, diese mittels *E. coli* zu produzieren. Erstmals gelang die Produktion von rekombinanten Fab Fragmenten in *E. coli* mit Hilfe eines Vektors im Jahr 1988 [18,155]. Aber auch die scFv Konstrukte können in *E. coli* mittels Vektor exprimiert werden [5].

Dabei werden, durch N-terminale Signalsequenzen ermöglicht, die Proteine in das periplasmatische Milieu der Bakterien gebracht, wo es dann zur korrekten Faltung der Proteine kommen kann.

Die Herstellung rekombinanter Konstrukte mittels Bakterienkulturen ist auch aktuell, aufgrund der Einfachheit und guten Handhabbarkeit, eines der führenden Verfahren zur Proteinexpression.

### **5.2.2.2 Antikörper**

Die Herstellung rekombinanter Antikörper ist etwas komplizierter. Im Gegensatz zu den Fab- und Schwerketten-Konstrukten werden hier eukaryotische Zellen benötigt. Die Struktur der Vollängen Antikörper ist zu komplex, als dass sie von einer Bakterienkultur in ausreichend großer Menge und funktionell intakt produziert werden könnte. Das intrazelluläre Milieu der Bakterien ist nicht dazu in der Lage, die notwendigen Disulfidbrücken auszubilden. Außerdem verfügen Bakterien nicht über die Möglichkeit zur posttranslationalen Modifikation. Im periplasmatischen Milieu von Bakterien ist es somit nicht ausreichend erfolgreich möglich, komplexe Proteine in großen Mengen herzustellen. Ursächlich sind hier auch die komplexen Faltungsmechanismen dieser Proteine (beispielsweise Vollängen Antikörper). Ein weiterer Grund ist die oben bereits erwähnte gesteigerte Immunogenität, bei zum Beispiel fehlender Glykosylierung [82].

Zur Herstellung rekombinanter Antikörper haben sich eukaryotische Expressionssysteme etabliert, wie auch das in dieser Arbeit verwendete der HEK293 Zellen [162]. Diese Systeme sind jedoch, verglichen mit den Bakterienkulturen, wesentlich komplexer und aufwendiger in ihrer Handhabung.

## **5.3 DLBCL Therapiekonzepte im Vergleich**

### **5.3.1 Nebenwirkungen der etablierten Therapiekonzepte**

In der Einleitung ist bereits im Detail auf die aktuell gebräuchlichen Therapiekonzepte in der Therapie der DLBCLs eingegangen worden. Allen voran konnten die Immunchemotherapie und die Stammzelltransplantationen in der Vergangenheit bahnbrechende Erfolge verzeichnen. Je nach Therapie und Ausgangslage konnten, wie bereits in der Einleitung ausführlich beschrieben, Heilungsraten von über 75% erreicht werden [129]. Ein großes Problem dieser systemischen und damit nicht

zielgerichteten therapeutischen Interventionen stellen mit Sicherheit die zahlreichen und ausgeprägten Nebenwirkungen dar.

### **5.3.1.1 Nebenwirkungen der Immunchemotherapie**

So effektiv die R-CHOP Immunchemotherapie für das DLBCL ist (siehe Einleitung), so zahlreich sind auch die Nebenwirkungen dieser Therapie. Bei der R-CHOP Therapie handelt es sich ganz grundlegend um eine systemische Therapie. Das hat den Vorteil, dass die Wirksamkeit der Therapie ubiquitär im Körper entfaltet werden kann, bringt jedoch wiederum den Nachteil mit sich, dass die Nebenwirkungen ebenfalls überall im Körper auftreten können. Die CHOP-Therapie besitzt sowohl alleine als auch in Kombination mit Rituximab eine große Bandbreite an unterschiedlichen Nebenwirkungen.

Mittels einer Studie wurde das CHOP mit dem R-CHOP Schema bei Patienten mit nicht vorbehandeltem DLBCL verglichen. In der Studie wurden die Nebenwirkungen dokumentiert und anschließend analysiert. Die Analyse, bezogen auf die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Nebenwirkungen innerhalb mindestens einem der acht verabreichten Zyklen, kam zu interessanten Ergebnissen. Die häufigste, nicht hämatologische Nebenwirkung war die Infektion, die in über der Hälfte der Fälle in beiden Therapie Schemata auftrat. Ebenfalls sehr häufige Nebenwirkungen waren Lebertoxizität (46% in R-CHOP und CHOP), Kardiotoxizität (47% in R-CHOP, 35% in CHOP) und Pulmotoxizität (33% in R-CHOP und 30% in CHOP). In 51% der R-CHOP Therapien und 54 % der CHOP Therapien kam es innerhalb des Behandlungsverlaufs zu einer Neurotoxizität. Auch renale Toxizität wurde in 11% der R-CHOP Therapien und 14% der CHOP Therapien beschrieben [40].

Zusammenfassend zeigt sich die breite Aufstellung und dramatische Häufigkeit der Nebenwirkungen einer CHOP beziehungsweise R-CHOP Therapie bei der Behandlung des DLBCL.

### **5.3.1.2 Nebenwirkungen der Stammzelltransplantation**

Sowohl die autologe als auch die allogene Stammzelltransplantation gehen trotz oder vielleicht genau wegen ihres großen therapeutischen Potenzials (siehe Einleitung) mit zum Teil verheerenden Nebenwirkungen einher.

In einer Studie, in der über zehn Jahre hinweg, insgesamt 69 autologe Stammzelltransplantationen untersucht worden sind, zeigte sich eine mit der Transplantation assoziierte Mortalität von 15%, wobei der Großteil dieser Todesfälle auf eine Sepsis zurückzuführen waren [8]. Aber auch zahlreiche weitere transplantationsbedingte Nebenwirkungen sind von Bedeutung gewesen. Mehrere Studien konnten bereits Zusammenhänge zwischen einer Stammzelltransplantation und verschiedenen unerwünschten Wirkungen zeigen.

So gehen die autologe als auch die allogene Stammzelltransplantation regelmäßig mit einer renalen Dysfunktion einher [111]. Ebenfalls besonders häufig werden Leberdysfunktionen unterschiedlichen Ausmaßes beobachtet. Ursächlich sind hier verschiedene Komplikationen, unter anderem die für

Stammzelltransplantationen typische venöse okklusive Leberkrankheit [111,123]. Auch pulmonale Komplikationen, wie eine diffuse alveoläre Hämorrhagie und kardiovaskuläre Toxizität, treten mit gewisser Regelmäßigkeit auf [3,112]. Nicht zuletzt spielen auch neurologische Komplikationen, wie beispielsweise eine mit der Hochdosischemotherapie assoziierte Enzephalopathie, eine entscheidende Rolle im Umgang und Management der Stammzelltransplantation [141].

Zusammenfassend zeigt sich auch hier ein breites Spektrum an verschiedensten, unter anderem regelmäßig auftretenden und mitunter verheerenden Nebenwirkungen mit teilweise letaler Bedrohung.

### **5.3.1.3 Nebenwirkungen der CAR T-Zell Therapie**

Bei der CAR T-Zell Therapie handelt es sich, im Unterschied zur Immunochemotherapie und den Stammzelltransplantation, um eine zielgerichtete Therapie. Wie in der Einleitung bereits beschrieben, zeichnen sich die bei DLBCL verwendeten CAR T-Zellen durch einen Rezeptor aus, der spezifisch das Antigen CD19 bindet und dadurch T-Zellen rekrutiert. Trotzdem kommt es zu erheblichen systemischen Nebenwirkungen, da das Immunsystem als den ganzen Körper beeinflussendes System, stimuliert wird.

Die CAR T-Zell Therapie bringt einige spezielle unerwünschte Wirkungen mit sich, die man so von einer konventionellen Tumorthherapie nicht kennt [117]. Besonders die akute Toxizität sticht hier hervor. Hier lässt sich primär das Cytokine release syndrom (CRS) nennen, das das am häufigsten beobachtete Phänomen der CAR T-Zell Therapie ist. Es handelt sich hierbei um eine überschießende systemische Inflammationsreaktion, die durch die Aktivierung der körpereigenen T-Zellen durch die CAR T-Zellen und der damit verbundenen massiven Ausschüttung von Zytokinen bedingt ist [94]. Das am zweithäufigsten beobachtete Phänomen im Verlauf der CAR T-Zell Therapie ist das CAR related encephalopathy syndrome (CRES), oder auch immune effector cell-associated neurotoxicity syndrome (ICANS) genannt [95,117]. Es manifestiert sich meistens zusammen mit dem CRS oder kurz darauffolgend. Die Pathophysiologie ist ebenso wenig vollständig verstanden, wie die des CRS. Es lässt sich aber ein Zusammenhang zwischen der Neurotoxizität und einem Zytokinsturm im Gehirn zeigen [65].

Abschließend lässt sich auch hier sagen, dass die CAR T-Zell Therapie mit einem nicht zu unterschätzenden Nebenwirkungsprofil vergesellschaftet ist.

## **5.3.2 Mögliche Vorteile der BAR Konstrukte**

### **5.3.2.1 Spezifische Toxizität**

Das BAR Konzept (b-cell receptor antigens for reverse targeting) zeichnet sich fundamental durch die spezifische Bindung eines Autoantigens, in Form des BAR-Konstrukts, an den BCR der im Fokus stehenden Tumorzelllinie aus. Betrachtet man nun den BCR der Tumorzellen als spezifisches Target

des therapeutisch verwendeten BAR Konstruktes, so wird der entscheidende Unterschied zu Therapiekonzepten wie beispielsweise der Immunchemotherapie oder auch der Stammzelltransplantation schnell klar. Es handelt sich bei dem Konzept der BAR Konstrukte um eine sehr zielgesteuerte und ultraspezifische Therapie. Man spricht hier im Allgemeinen auch von einer targeted therapy. Es konnte in einer Untersuchung bereits gezeigt werden, dass das ARS2 als Autoantigen den BCR von 60% der DLBCL Zelllinien vom ABC-Typ bindet. Im Vergleich war das bei keiner von vier untersuchten DLBCL Zelllinien vom GCB-Typ, bei keiner von neun untersuchten Mantelzelllymphom Zelllinien und bei keiner von elf untersuchten primären ZNS-Lymphom Zelllinien der Fall [165].

Der entscheidende Vorteil des BAR Konzeptes ist folglich, dass das Ziel der antitumorösen Therapie, nämlich der BCR der zu therapierenden DLBCL Zelllinie vom ABC-Typ, sehr spezifisch mit dem BAR-Konstrukt interagiert. Damit kann demzufolge auch die zytotoxische Wirkung der BAR Konstrukte sehr spezifisch an dem gewünschten Ort, nämlich den zu therapierenden Tumorzellen, entfaltet werden.

### **5.3.2.2 Günstiges Nebenwirkungsprofil**

Im Vergleich zu den oben beschriebenen, sehr ausgeprägten und vielfältigen Nebenwirkungen der etablierten Therapien wie beispielsweise der konventionellen Chemotherapie, lässt sich mutmaßen, dass die Nebenwirkungen der BAR Konstrukte wesentlich geringer ausfallen könnten. Die Vermutung kommt unter anderem dadurch zu Stande, dass, wie schon oben beschrieben, die BAR Therapie sehr spezifisch an der Tumorzelle selbst wirkt und es somit nicht naheliegend ist, dass es zu schweren systemischen unerwünschten Wirkungen kommt. Trotzdem muss man sagen, dass man natürlich erst eine echte Aussage über das Nebenwirkungsprofil und die Häufigkeit von unerwünschten Wirkungen treffen kann, nachdem dies durch weiterführende Untersuchungen und Experimente in aller Ausführlichkeit untersucht worden ist.

### **5.3.2.3 Möglichkeit der Therapie alter und/oder vorerkrankter Patienten**

Ein weiterer eventueller Vorteil des BAR Konzeptes ist die Möglichkeit der Eignung zur Therapie besonders alter oder vorerkrankter Patienten. Diese Vermutung steht in engem Zusammenhang mit der bereits beschriebenen hohen Spezifität und dem möglicherweise gering ausgeprägten, systemischen Nebenwirkungsprofil. Zurzeit stehen zur Behandlung älterer und vorerkrankter Patienten bereits unterschiedliche Therapiekonzepte wie zum einen das Polatuzumab, aber auch beispielsweise die CAR T-Zell Therapie, zur Verfügung. Eine Auswertung der ZUMA-1 Studie konnte bereits zeigen, dass bei der Therapie mit axicabtagene-ciloleucel (CAR-T-Zellen) zwischen Patienten über 65 Jahren und Patienten unter 65 Jahren in Bezug auf die unerwünschten Wirkungen und die therapieassoziierte Mortalität kein nennenswerter Unterschied besteht [118].

Es lässt sich also mutmaßen, dass das BAR Konzept aufgrund seiner Ähnlichkeit in Bezug auf Spezifität und Wirkprinzipien eher mit solchen neuartigen Therapiekonzepten wie den CAR T-Zellen oder dem

Polatumab verglichen werden kann als mit der Immunochemotherapie und den Stammzelltransplantationen.

## **5.4 Ein Ausblick**

### **5.4.1 Andere BAR Konstrukte**

Das Prinzip der BAR-Konstrukte hat sich grundsätzlich in dieser Arbeit als sehr erfolgreich erwiesen. Denkbar ist es also, dieses Konzept auch für andere, antikörperähnliche BAR-Konstrukte zu evaluieren, die in dieser Arbeit nicht untersucht worden sind.

#### **5.4.1.1 Bispezifische Konstrukte und Single Chain Konstrukte**

##### **Bispezifische Konstrukte im Allgemeinen**

Unter bispezifischen Konstrukten versteht man solche, die mit zwei verschiedenen variablen Domänen innerhalb eines Moleküls dazu in der Lage sind, zwei verschiedene Strukturen zu binden.

Das erste zugelassene bispezifische Konstrukt zur Therapie maligner Erkrankungen seiner Art war das Catumaxumab, das zum einen das epitheliale Zelladhäsionsmolekül und zum anderen das CD3 Molekül der T-Zellen bindet [153]. Es geht also primär um die Rekrutierung der T-Zelle als Effektorzelle mit dem Ziel, die Tumorzelle zu töten.

Mittlerweile hat man sich teilweise davon distanziert, für die bispezifischen Konstrukte vollständige Antikörper zu verwenden. Zur T-Zell Rekrutierung mit bispezifischen Konstrukten werden häufig single-chain Konstrukte (siehe folgend) verwendet, die dann auch BiTE-Antikörper (Bi-specific T-cell engager) genannt werden. Ein BiTE Antikörper mit jeweils einer Domäne, die das CD19 der B-Zelle beziehungsweise das CD3 der T-Zelle bindet, ist das Blinatumomab [100]. Eingesetzt wird es unter anderem bei Erwachsenen mit Akuter lymphatischer Leukämie [83].

##### **Single Chain Konstrukte im Allgemeinen**

Die single-chain Konstrukte im Allgemeinen, kurz scFv (single-chain fragment variable), bestehen lediglich aus den beiden variablen Domänen der schweren und der leichten Kette, die durch einen Linker miteinander verbunden sind. Der N-Terminus der  $V_H$ -Domäne ist hierbei mit dem C-Terminus der  $V_L$ -Domäne über den Linker verbunden [21]. Mittlerweile existieren jedoch auch Konstrukte, bei denen der N-Terminus der  $V_L$ -Domäne mit dem C-Terminus der  $V_H$ -Domäne verbunden ist. Sie besitzen ähnliche Eigenschaften [35].

Single Chain Konstrukte werden aufgrund ihrer Eigenschaften (siehe 5.2) auch häufig in der Nuklearmedizin als Vehikel für Radionuklide, in der Radiodiagnostik oder auch in der Radiotherapie verwendet [61,75].

Aber auch das Konzept der ADC funktioniert mit den scFv hervorragend. Als Beispiel lässt sich ein scFv nennen, das den fetalen Acetylcholinrezeptor bindet und mit dem ETA-Toxin verbunden ist. In der Zellkultur sowie auch im Mausmodell konnte eine Zytolyse beziehungsweise eine Größenreduktion des Tumors einer Rhabdomyosarkom Zelllinie erfolgreich gezeigt werden [57].

### **Mögliche BAR Konstrukte**

Übertragen auf das BAR Konzept wäre ein bispezifisches Format, mit einer ARS2 Domäne auf der einen Seite und einer CD3 Domäne zur T-Zell Rekrutierung auf der anderen Seite, durchaus denkbar. Ein solches bispezifisches ARS2-CD3 Konstrukt im scFv Format wurde bereits erfolgreich beim DLBCL untersucht [19].

Ebenfalls denkbar wäre es nun auch, das bispezifische Format mit ARS2 und CD3 in Form eines Vollängens Antikörpers zu konzipieren und anschließend tiefergehend zu untersuchen.

Auch denkbar wäre ein single-chain Konstrukt, welches zwei identische ARS2 Domänen (vorzugsweise die in dieser Arbeit erfolgreich getestete ARS2 Domäne mit den AA 343-466) über einen Linker kovalent miteinander verknüpft. Zusätzlich könnte das Konstrukt dann an ein Toxin gekoppelt werden, beispielsweise mit dem in dieser Arbeit bereits verwendeten ETA. Bei diesem ADC Konzept wäre dann auch wiederum zunächst die Bindung auf der U2932 Zelllinie sowie die anschließende Zytotoxizität zu überprüfen.

## **5.4.2 Potenzial der untersuchten BAR Konstrukte dieser Arbeit**

### **5.4.2.1 BAR Fab-Konstrukt**

Da das BAR Fab-Konstrukt weder die Fähigkeit besitzt, eine CDC oder ADCC nach seiner Bindung zu initiieren, noch eine direkte Zytotoxizität über ein gekoppeltes Toxin vorweisen kann, sind die Möglichkeiten zum therapeutischen Einsatz in dieser Form als reines Fab-Konstrukt eher begrenzt. Das Konstrukt diente in dieser Arbeit hauptsächlich der Bahnung der weiteren, grundlegend darauf basierenden, BAR Konstrukte.

### **5.4.2.2 BAR Fab-ETA-Konstrukt**

Grundsätzlich existieren für die ADCs zwei verschiedene Konzepte.

Das eine Konzept stützt sich auf die Internalisierung des Konstrukts und die damit verbundene Entfaltung der zytotoxischen Wirkung innerhalb der Zelle. Hierbei bleiben das Toxin und die antigenbindende Komponente dauerhaft miteinander verbunden. Auch in dieser Arbeit wurde dieses Konzept verfolgt.

Das andere Konzept konzentriert sich auf die Bindung des Konstrukts auf der Zelloberfläche und die nachfolgende Lösung der Bindung zwischen Toxin und restlichem Konstrukt. Hierfür wird ein weniger stabiler Linker benötigt, der die Eigenschaft besitzt, abhängig von seinem umgebenen Milieu, seine Bindung zu lösen. Es gibt verschiedene Arten von Linkern, die diese Eigenschaft in unterschiedlicher Ausprägung besitzen [134].

Ein Beispiel für ein funktionierendes ADC Konzept aus der klinischen Praxis ist das Trastuzumab emtansine, bei dem der human epidermal growth factor receptor 2 (her2) Antikörper Trastuzumab mit dem Mitosehemmstoff DM1 kombiniert wird. Dieses Konzept wird zur Therapie her2 positiver Mammakarzinome verwendet [174].

Das Problem des BAR Fab-ETA-Konstrukts in dieser Arbeit war die fehlende Internalisierung. Es lassen sich nun einige Vermutungen über den Grund der nicht erfolgten Internalisierung anstellen.

Zum einen könnte es sein, dass die Größe des Fab-ETA Konstrukts mit circa 90 kDa ein Problem bei dem Vorgang der Internalisierung darstellt. Eine weitere mögliche Ursache für dieses Problem könnte die, durch die zwei ARS2 Domänen bedingte, bivalente Bindung des Konstrukts an den Tumorzellen sein. Daraus ergibt sich ein möglicher Lösungsansatz, bei dem durch Austausch einer der beiden ARS2 Domänen lediglich eine monovalente Bindung zu Stande kommen würde.

Auch könnte man jedoch versuchen, einen anderen Linker für die Verknüpfung von ETA und Fab zu verwenden, um das zweite Konzept der ADCs, bei dem sich das Toxin vom restlichen Konstrukt trennt und nicht internalisiert werden muss, zu verfolgen.

Schließlich könnte man es ebenfalls einfach mit einem anderen Toxin versuchen. Die Möglichkeiten sind zahlreich und bieten Potenzial für weiterführende Experimente.

### **5.4.2.3 BAR Schwerketten-ETA-Konstrukt**

Mit dem BAR Schwerketten-ETA-Konstrukt wurde zum einen die Größe reduziert (circa 55 kDa), zum anderen kommt es bei diesem Konstrukt nur noch zu einer monovalenten Bindung auf den Tumorzellen. Das BAR Schwerketten-Konstrukt führte nun schließlich zu einer erfolgreichen Zytolyse, nachdem es erfolgreich von der Zelle internalisiert wurde.

Die geringe Größe des Konstrukts könnte womöglich jedoch in vivo zu einer schnellen, renalen Elimination des Konstrukts führen. Vergleicht man das BAR Schwerketten-ETA-Konstrukt mit ADCs, die in der klinischen Tumorthherapie verwendet werden, so fällt auf, dass die meisten dieser ADCs aus monoklonalen Antikörpern und einer Toxin Komponente aufgebaut sind. Verglichen mit dem Schwerketten Konstrukt, handelt es sich also um eine andere Größendimension.

Als Beispiel ist das Gemtuzumab ozogamicin Konstrukt zu nennen, ein CD33 Antikörper mit einem bakteriellen Toxin, welches bei der akuten myeloischen Leukämie verwendet wird [14]. Ein anderes

Beispiel ist das Brentuximab vedotin, ein CD30 Antikörper gekoppelt an ein Zytostatikum. Verwendet wird dieses Konstrukt bei Non Hodgkin Lymphomen [17].

Wie zuvor bereits schon beschrieben, wäre ein möglicher Lösungsansatz das Konstrukt an PEG oder humanes Albumin zu koppeln, was die Halbwertszeit deutlich vergrößern würde [2,79]. Fraglich ist dann jedoch, ob die erfolgreiche Internalisierung und die damit verbundene Zytotoxizität erhalten bliebe.

#### **5.4.2.4 BAR Antikörper Konstrukt**

Das BAR Antikörper Konstrukt ist womöglich das vielversprechendste Konstrukt dieser Arbeit. Es hat sich bereits in Bezug auf seine Bindung auf den Tumorzellen als auch bezogen auf die Zytotoxizität als erfolgreiches Konzept erwiesen. Die jüngste Vergangenheit konnte zudem zeigen, dass das Konzept der monoklonalen Antikörper in der Therapie verschiedenster maligner Erkrankungen sehr erfolgsversprechend ist und es erheblich zum Therapieerfolg beitragen kann [154].

In einem nächsten Schritt könnte nun mit Hilfe eines Maus Modells untersucht werden, ob und inwiefern sich die in der Zellkultur gezeigten positiven Ergebnisse des ARS2 BAR Antikörpers bezüglich der zytotoxischen Effekte in vivo an Tumoren entsprechender Zelllinien reproduzieren lassen. Bei vielversprechendem Verlauf der Experimente könnte man sich auch hier weitergehend ein erfolgreiches klinisches Konzept vorstellen.

Eine ganz andere Option für das BAR Antikörper Konstrukt wäre die kovalente Bindung an ein Toxin und das damit verbundene agieren als ADC. Aufgrund der bereits oben aufgeführten erfolgreichen Beispiele von vergleichbaren Konzepten aus dem klinischen Alltag, besteht hier ebenfalls das Potenzial für ein erfolgreiches Antikörper Konzept [14].

Zusammenfassend lässt sich wohl sagen, dass der BAR Antikörper auf jeden Fall das zentrale Konstrukt dieser Arbeit ist und wohl auch das größte Potenzial aller in dieser Arbeit untersuchten Konstrukte besitzt.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Abramson JS, Palomba ML, Gordon LI, Lunning MA, Wang ML, Arnason JE, Mehta A, Purev E, Maloney DG, Andreadis C, Sehgal AR, Solomon SR, Ghosh N, Albertson T, Garcia J, Kostic A, Li D, Kim Y, Siddiqi T (2019) Pivotal Safety and Efficacy Results from Transcend NHL 001, a Multicenter Phase I Study of Lisocabtagene Maraleucel (liso-cel) in Relapsed/Refractory (R/R) Large B Cell Lymphomas. *Blood* 134:241–241
2. Adams R, Griffin L, Compson JE, Jairaj M, Baker T, Ceska T, West S, Zaccheo O, Dave E, Lawson AD, Humphreys DP, Heywood S (2016) Extending the half-life of a fab fragment through generation of a humanized anti-human serum albumin Fv domain: An investigation into the correlation between affinity and serum half-life. *MAbs* 8:1336–1346
3. Afessa B, Tefferi A, Litzow MR, Peters SG (2002) Outcome of Diffuse Alveolar Hemorrhage in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. *Am J Respir Crit Care Med* 166:1364–1368
4. Agathangelidis A, Darzentas N, Hadzidimitriou A, Brochet X, Murray F, Yan X-J, Davis Z, van Gastel-Mol EJ, Tresoldi C, Chu CC, Cahill N, Giudicelli V, Tichy B, Pedersen LB, Foroni L, Bonello L, Janus A, Smedby K, Anagnostopoulos A, Merle-Beral H, Laoutaris N, Juliusson G, di Celle PF, Pospisilova S, Jurlander J, Geisler C, Tsaftaris A, Lefranc M-P, Langerak AW, Oscier DG, Chiorazzi N, Belessi C, Davi F, Rosenquist R, Ghia P, Stamatopoulos K (2012) Stereotyped B-cell receptors in one-third of chronic lymphocytic leukemia: a molecular classification with implications for targeted therapies. *Blood* 119:4467–4475
5. Ahmad ZA, Yeap SK, Ali AM, Ho WY, Alitheen NBM, Hamid M (2012) scFv antibody: principles and clinical application. *Clin Dev Immunol* 2012:980250
6. Aksentijevich I, Jones RJ, Ambinder RF, Garrett-Mayer E, Flinn IW (2006) Clinical outcome following autologous and allogeneic blood and marrow transplantation for relapsed diffuse large-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Biol Blood Marrow Transplant* 12:965–972
7. Alderson KL, Sondel PM (2011) Clinical cancer therapy by NK cells via antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *J Biomed Biotechnol* 2011:379123
8. Ali N, Adil SN, Shaikh MU (2015) Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation-10 Years of Data From a Developing Country. *Stem Cells Transl Med* 4:873–877
9. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X, Powell JJ, Yang L, Marti GE, Moore T, Hudson J, Lu L, Lewis DB, Tibshirani R, Sherlock G, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Warnke R, Levy R, Wilson W, Grever MR, Byrd JC, Botstein D, Brown PO, Staudt LM (2000) Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 403:503–511
10. Andorsky DJ, Yamada RE, Said J, Pinkus GS, Betting DJ, Timmerman JM (2011) Programmed death ligand 1 is expressed by non-hodgkin lymphomas and inhibits the activity of tumor-associated T cells. *Clin Cancer Res* 17:4232–4244
11. Anfinsen CB (1973) Principles that Govern the Folding of Protein Chains. *Science* 181:223–230
12. Ansell SM, Hurvitz SA, Koenig PA, LaPlant BR, Kabat BF, Fernando D, Habermann TM, Inwards DJ, Verma M, Yamada R, Erlichman C, Lowy I, Timmerman JM (2009) Phase I study of ipilimumab, an anti-CTLA-4 monoclonal antibody, in patients with relapsed and refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Clin Cancer Res* 15:6446–6453
13. Ansell SM, Minnema MC, Johnson P, Timmerman JM, Armand P, Shipp MA, Rodig SJ, Ligon AH, Roemer MGM, Reddy N, Cohen JB, Assouline S, Poon M, Sharma M, Kato K, Samakoglu S, Sumbul A, Grigg A (2019) Nivolumab for Relapsed/Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma in Patients Ineligible for or Having Failed Autologous Transplantation: A Single-Arm, Phase II Study. *J Clin Oncol* 37:481–489
14. Appelbaum FR, Bernstein ID (2017) Gemtuzumab ozogamicin for acute myeloid leukemia. *Blood* 130:2373–2376

15. Armand P, Nagler A, Weller EA, Devine SM, Avigan DE, Chen Y-B, Kaminski MS, Holland HK, Winter JN, Mason JR, Fay JW, Rizzieri DA, Hosing CM, Ball ED, Uberti JP, Lazarus HM, Mapara MY, Gregory SA, Timmerman JM, Andorsky D, Or R, Waller EK, Rotem-Yehudar R, Gordon LI (2013) Disabling immune tolerance by programmed death-1 blockade with pidilizumab after autologous hematopoietic stem-cell transplantation for diffuse large B-cell lymphoma: results of an international phase II trial. *J Clin Oncol* 31:4199–4206
16. Bartlett JB, Dredge K, Dalglish AG (2004) The evolution of thalidomide and its IMiD derivatives as anticancer agents. *Nat Rev Cancer* 4:314–322
17. Berger GK, McBride A, Lawson S, Royball K, Yun S, Gee K, Bin Riaz I, Saleh AA, Puvvada S, Anwer F (2017) Brentuximab vedotin for treatment of non-Hodgkin lymphomas: A systematic review. *Crit Rev Oncol Hematol* 109:42–50
18. Better M, Chang CP, Robinson RR, Horwitz AH (1988) *Escherichia coli* secretion of an active chimeric antibody fragment. *Science* 240:1041–1043
19. Bewarder M, Preuss K-D, Fadle N, Regitz E, Thurner L, Pfreundschuh M (2016) CD3/Bars: A Novel Bispecific Format for the Treatment of B-Cell Lymphomas. *ASH Abstract December 2, 2016 Blood* 128:3516–3516
20. Bewarder M, Körbel C, Laschke MW, Menger MD, Kiefer M, Kaddu-Mulindwa D, Will H, Goerens L, Fadle N, Regitz E, Stilgenbauer S, Neumann F, Preuss KD, Pfreundschuh M, Thurner L (2019) The B-Cell Receptor Antigen ARS2 Can be Integrated into a BAR-Body Format to Treat Diffuse Large B-Cell Lymphomas in Xenograft Mouse Models. *ASH Abstract November 13, 2019 Blood* 134:2860–2860
21. Bird RE, Hardman KD, Jacobson JW, Johnson S, Kaufman BM, Lee SM, Lee T, Pope SH, Riordan GS, Whitlow M (1988) Single-chain antigen-binding proteins. *Science* 242:423–426
22. Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513–1523
23. Blank C, Gajewski TF, Mackensen A (2005) Interaction of PD-L1 on tumor cells with PD-1 on tumor-specific T cells as a mechanism of immune evasion: implications for tumor immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 54:307–314
24. Boezi JA, Cowie DB (1961) Kinetic studies of beta-galactosidase induction. *Biophys J* 1:639–647
25. Bohn W (1978) A fixation method for improved antibody penetration in electron microscopical immunoperoxidase studies. *J Histochem Cytochem* 26:293–297
26. Bornhorst JA, Falke JJ (2000) [16] Purification of Proteins Using Polyhistidine Affinity Tags. *Methods Enzymol* 326:245–254
27. Bossy D, Milili M, Zucman J, Thomas G, Fougereau M, Schiff C (1991) Organization and expression of the lambda-like genes that contribute to the mu-psi light chain complex in human pre-B cells. *Int Immunol* 3:1081–1090
28. Bowden GA, Georgiou G (1990) Folding and aggregation of beta-lactamase in the periplasmic space of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 265:16760–16766
29. Burger JA, Tedeschi A, Barr PM, Robak T, Owen C, Ghia P, Bairey O, Hillmen P, Bartlett NL, Li J, Simpson D, Grosicki S, Devereux S, McCarthy H, Coutre S, Quach H, Gaidano G, Maslyak Z, Stevens DA, Janssens A, Offner F, Mayer J, O'Dwyer M, Hellmann A, Schuh A, Siddiqi T, Polliack A, Tam CS, Suri D, Cheng M, Clow F, Styles L, James DF, Kipps TJ (2015) Ibrutinib as Initial Therapy for Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med* 373:2425–2437
30. Caligiuri MA (2008) Human natural killer cells. *Blood* 112:461–469
31. Carter PJ (2006) Potent antibody therapeutics by design. *Nat Rev Immunol* 6:343–357

32. Carter PJ, Senter PD (2008) Antibody-drug conjugates for cancer therapy. *Cancer J* 14:154–169
33. Charrot S, Hallam S (2019) CAR-T Cells: Future Perspectives. *HemaSphere* 3:e188
34. Chaudhury C, Mehnaz S, Robinson JM, Hayton WL, Pearl DK, Roopenian DC, Anderson CL (2003) The major histocompatibility complex-related Fc receptor for IgG (FcRn) binds albumin and prolongs its lifespan. *J Exp Med* 197:315–322
35. Cheng Y, Li Z, Xi H, Gu T, Yuan R, Chen X, Jiang C, Kong W, Wu Y (2016) A VL-linker-VH Orientation Dependent Single Chain Variable Antibody Fragment Against Rabies Virus G Protein with Enhanced Neutralizing Potency in vivo. *Protein Pept Lett* 23:24–32
36. Cheson BD, Fisher RI, Barrington SF, Cavalli F, Schwartz LH, Zucca E, Lister TA (2014) Recommendations for Initial Evaluation, Staging, and Response Assessment of Hodgkin and Non-Hodgkin Lymphoma: The Lugano Classification. *J Clin Oncol* 32:3059–3067
37. Chien A, Edgar DB, Trela JM (1976) Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol* 127:1550–1557
38. Chirino AJ, Ary ML, Marshall SA (2004) Minimizing the immunogenicity of protein therapeutics. *Drug Discov Today* 9:82–90
39. Chmielewski M, Kopecky C, Hombach AA, Abken H (2011) IL-12 release by engineered T cells expressing chimeric antigen receptors can effectively Muster an antigen-independent macrophage response on tumor cells that have shut down tumor antigen expression. *Cancer Res* 71:5697–5706
40. Coiffier B, Lepage E, Briere J, Herbrecht R, Tilly H, Bouabdallah R, Morel P, Van Den Neste E, Salles G, Gaulard P, Reyes F, Lederlin P, Gisselbrecht C (2002) CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 346:235–242
41. Coiffier B, Thieblemont C, Van Den Neste E, Lepage G, Plantier I, Castaigne S, Lefort S, Marit G, Macro M, Sebban C, Belhadj K, Bordessoule D, Fermé C, Tilly H (2010) Long-term outcome of patients in the LNH-98.5 trial, the first randomized study comparing rituximab-CHOP to standard CHOP chemotherapy in DLBCL patients: a study by the Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte. *Blood* 116:2040–2045
42. Cunningham D, Hawkes EA, Jack A, Qian W, Smith P, Mouncey P, Pocock C, Ardeshta KM, Radford JA, McMillan A, Davies J, Turner D, Kruger A, Johnson P, Gambell J, Linch D (2013) Rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisolone in patients with newly diagnosed diffuse large B-cell non-Hodgkin lymphoma: a phase 3 comparison of dose intensification with 14-day versus 21-day cycles. *Lancet* 381:1817–1826
43. Dameshek W, Schwartz RS (1959) Leukemia and auto-immunization- some possible relationships. *Blood* 14:1151–1158
44. Davids MS, Roberts AW, Seymour JF, Pagel JM, Kahl BS, Wierda WG, Puvvada S, Kipps TJ, Anderson MA, Salem AH, Dunbar M, Zhu M, Peale F, Ross JA, Gressick L, Desai M, Kim SY, Verdugo M, Humerickhouse RA, Gordon GB, Gerecitano JF (2017) Phase I First-in-Human Study of Venetoclax in Patients With Relapsed or Refractory Non-Hodgkin Lymphoma. *J Clin Oncol* 35:826–833
45. Davis RE, Brown KD, Siebenlist U, Staudt LM (2001) Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. *J Exp Med* 194:1861–1874
46. Davis RE, Ngo VN, Lenz G, Tolar P, Young R, Romesser PB, Kohlhammer H, Lamy L, Zhao H, Yang Y, Xu W, Shaffer AL, Wright G, Xiao W, Powell J, Jiang J, Thomas CJ, Rosenwald A, Ott G, Muller-Hermelink HK, Gascoyne RD, Connors JM, Rimsza LM, Campo E, Jaffe ES, Delabie J, Smeland EB, Fisher RI, Braziel RM, Tubbs RR, Cook JR, Weisenburger DD, Chan WC, Pierce SK, Staudt LM (2010) Chronic Active B Cell Receptor Signaling in Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Nature* 463:88–92

47. de Vos S, Swinnen LJ, Wang D, Reid E, Fowler N, Cordero J, Dunbar M, Enschede SH, Nolan C, Petrich AM, Ross JA, Salem AH, Verdugo M, Agarwal S, Zhou L, Kozloff M, Nastoupil LJ, Flowers CR (2018) Venetoclax, bendamustine, and rituximab in patients with relapsed or refractory NHL: a phase Ib dose-finding study. *Ann Oncol* 29:1932–1938
48. Dimopoulos M, Spencer A, Attal M, Prince HM, Harousseau J-L, Dmoszynska A, San Miguel J, Hellmann A, Facon T, Foà R, Corso A, Masliak Z, Olesnyckyj M, Yu Z, Patin J, Zeldis JB, Knight RD, Multiple Myeloma (010) Study Investigators (2007) Lenalidomide plus dexamethasone for relapsed or refractory multiple myeloma. *N Engl J Med* 357:2123–2132
49. Donjerković D, Scott DW (2000) Activation-induced cell death in B lymphocytes. *Cell Res* 10:179–192
50. Dunleavy K, Pittaluga S, Czuczman MS, Dave SS, Wright G, Grant N, Shovlin M, Jaffe ES, Janik JE, Staudt LM, Wilson WH (2009) Differential efficacy of bortezomib plus chemotherapy within molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 113:6069–6076
51. Ferreri AJM, Sassone M, Zaja F, Re A, Spina M, Rocco AD, Fabbri A, Stelitano C, Frezzato M, Rusconi C, Zambello R, Couto S, Ren Y, Arcari A, Bertoldero G, Nonis A, Scarfò L, Calimeri T, Cecchetti C, Chiozzotto M, Govi S, Ponzoni M (2017) Lenalidomide maintenance in patients with relapsed diffuse large B-cell lymphoma who are not eligible for autologous stem cell transplantation: an open label, single-arm, multicentre phase 2 trial. *Lancet Haematol* 4:e137–e146
52. Feugier P, Van Hoof A, Sebban C, Solal-Celigny P, Bouabdallah R, Fermé C, Christian B, Lepage E, Tilly H, Morschhauser F, Gaulard P, Salles G, Bosly A, Gisselbrecht C, Reyes F, Coiffier B (2005) Long-term results of the R-CHOP study in the treatment of elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma: a study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *J Clin Oncol* 23:4117–4126
53. Fischer K, Al-Sawaf O, Fink AM, Dixon M, Bahlo J, Warburton S, Kipps TJ, Weinkove R, Robinson S, Seiler T, Opat S, Owen C, Lopez J, Humphrey K, Humerickhouse R, Tausch E, Frenzel L, Eichhorst B, Wendtner CM, Stilgenbauer S, Langerak AW, van Dongen JJM, Bottcher S, Ritgen M, Goede V, Mobasher M, Hallek M (2017) Venetoclax and obinutuzumab in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 129:2702–2705
54. Fisher RI, Gaynor ER, Dahlborg S, Oken MM, Grogan TM, Mize EM, Glick JH, Coltman CA, Miller TP (1993) Comparison of a standard regimen (CHOP) with three intensive chemotherapy regimens for advanced non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 328:1002–1006
55. Freeman CL, Sehn LH (2018) A tale of two antibodies: obinutuzumab versus rituximab. *Br J Haematol* 182:29–45
56. Freitag J, Heink S, Roth E, Wittmann J, Jäck H-M, Kamradt T (2014) Towards the Generation of B-Cell Receptor Retrogenic Mice. *PLOS ONE* 9:e109199
57. Gattenlöhner S, Jörissen H, Huhn M, Vincent A, Beeson D, Tzartos S, Mamalaki A, Etschmann B, Muller-Hermelink HK, Koscielniak E, Barth S, Marx A (2010) A human recombinant autoantibody-based immunotoxin specific for the fetal acetylcholine receptor inhibits rhabdomyosarcoma growth in vitro and in a murine transplantation model. *J Biomed Biotechnol* 2010:187621
58. Gettinger SN, Horn L, Gandhi L, Spigel DR, Antonia SJ, Rizvi NA, Powderly JD, Heist RS, Carvajal RD, Jackman DM, Sequist LV, Smith DC, Leming P, Carbone DP, Pinder-Schenck MC, Topalian SL, Hodi FS, Sosman JA, Sznol M, McDermott DF, Pardoll DM, Sankar V, Ahlers CM, Salvati M, Wigginton JM, Hellmann MD, Kollia GD, Gupta AK, Brahmer JR (2015) Overall Survival and Long-Term Safety of Nivolumab (Anti-Programmed Death 1 Antibody, BMS-936558, ONO-4538) in Patients With Previously Treated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol* 33:2004–2012

59. Gisselbrecht C, Glass B, Mounier N, Singh Gill D, Linch DC, Trneny M, Bosly A, Ketterer N, Shpilberg O, Hagberg H, Ma D, Brière J, Moskowitz CH, Schmitz N (2010) Salvage regimens with autologous transplantation for relapsed large B-cell lymphoma in the rituximab era. *J Clin Oncol* 28:4184–4190
60. Glennie MJ, French RR, Cragg MS, Taylor RP (2007) Mechanisms of killing by anti-CD20 monoclonal antibodies. *Mol Immunol* 44:3823–3837
61. Goldenberg DM (2002) Targeted therapy of cancer with radiolabeled antibodies. *J Nucl Med* 43:693–713
62. Green MR, Monti S, Rodig SJ, Juszczynski P, Currie T, O'Donnell E, Chapuy B, Takeyama K, Neuberg D, Golub TR, Kutok JL, Shipp MA (2010) Integrative analysis reveals selective 9p24.1 amplification, increased PD-1 ligand expression, and further induction via JAK2 in nodular sclerosing Hodgkin lymphoma and primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood* 116:3268–3277
63. Green PHR, Fleischauer AT, Bhagat G, Goyal R, Jabri B, Neugut AI (2003) Risk of malignancy in patients with celiac disease. *Am J Med* 115:191–195
64. Grupp SA, Kalos M, Barrett D, Aplenc R, Porter DL, Rheingold SR, Teachey DT, Chew A, Hauck B, Wright JF, Milone MC, Levine BL, June CH (2013) Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med* 368:1509–1518
65. Gust J, Hay KA, Hanafi LA, Li D, Myerson D, Gonzalez-Cuyar LF, Yeung C, Liles WC, Wurfel M, Lopez JA, Chen J, Chung D, Harju-Baker S, Ozpolat T, Fink KR, Riddell SR, Maloney DG, Turtle CJ (2017) Endothelial Activation and Blood-Brain Barrier Disruption in Neurotoxicity after Adoptive Immunotherapy with CD19 CAR-T Cells. *Cancer Discov* 7:1404–1419
66. Habermann TM, Weller EA, Morrison VA, Gascoyne RD, Cassileth PA, Cohn JB, Dakhil SR, Woda B, Fisher RI, Peterson BA, Horning SJ (2006) Rituximab-CHOP versus CHOP alone or with maintenance rituximab in older patients with diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 24:3121–3127
67. Hadzidimitriou A, Agathangelidis A, Darzentas N, Murray F, Delfau-Larue M-H, Pedersen LB, Lopez AN, Dagklis A, Rombout P, Beldjord K, Kolstad A, Dreyling MH, Anagnostopoulos A, Tsaftaris A, Mavragani-Tsipidou P, Rosenwald A, Ponzoni M, Groenen P, Ghia P, Sander B, Papadaki T, Campo E, Geisler C, Rosenquist R, Davi F, Pott C, Stamatopoulos K (2011) Is there a role for antigen selection in mantle cell lymphoma? Immunogenetic support from a series of 807 cases. *Blood* 118:3088–3095
68. Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57–70
69. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Cleary ML, Delsol G, De Wolf-Peeters C, Falini B, Gatter KC (1994) A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 84:1361–1392
70. Held G, Murawski N, Ziepert M, Fleckenstein J, Pöschel V, Zwick C, Bittenbring J, Hänel M, Wilhelm S, Schubert J, Schmitz N, Löffler M, Rube C, Pfreundschuh M (2014) Role of radiotherapy to bulky disease in elderly patients with aggressive B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 32:1112–1118
71. Held G, Houot R, Avigdor A, André M, Dabrowska-Iwanicka A, Jaeger U, Tonino S, Trneny M, Maria G da S, Gaulard P, Molina TJ, Rosenwald A, Rymkiewicz G, Fest T, Tarte K, Loeffler M, Ziepert M, Altmann B, Poeschel V, Haioun C (2019) Niveau, a Phase 3 Study for Pts with B- or T-Cell Aggressive Non-Hodgkin Lymphoma in First Relapse or Progression Not Eligible for High-Dose Chemotherapy (HDT), Testing Nivolumab in Combination with Gemcitabine, Oxaliplatin (GemOx), Plus Rituximab (R) in Case of B-Cell Lymphoma. *Blood* 134:5311–5311
72. Hoogenboom HR, de Bruine AP, Hufton SE, Hoet RM, Arends JW, Roovers RC (1998) Antibody phage display technology and its applications. *Immunotechnology* 4:1–20

73. Hopp TP, Prickett KS, Price VL, Libby RT, March CJ, Pat Cerretti D, Urdal DL, Conlon PJ (1988) A Short Polypeptide Marker Sequence Useful for Recombinant Protein Identification and Purification. *Nat Biotechnol* 6:1204–1210
74. Hu S, Xu-Monette ZY, Tzankov A, Green T, Wu L, Balasubramanyam A, Liu W, Visco C, Li Y, Miranda RN, Montes-Moreno S, Dybkaer K, Chiu A, Orazi A, Zu Y, Bhagat G, Richards KL, Hsi ED, Choi WWL, Zhao X, van Krieken JH, Huang Q, Huh J, Ai W, Ponzoni M, Ferreri AJM, Zhou F, Slack GW, Gascoyne RD, Tu M, Variakojis D, Chen W, Go RS, Piris MA, Møller MB, Medeiros LJ, Young KH (2013) MYC/BCL2 protein coexpression contributes to the inferior survival of activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphoma and demonstrates high-risk gene expression signatures: a report from The International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program. *Blood* 121:4021–4031
75. Hudson PJ, Souriau C (2003) Engineered antibodies. *Nat Med* 9:129–134
76. Hurlley SM, Helenius A (1989) Protein oligomerization in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Cell Biol* 5:277–307
77. International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project (1993) A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 329:987–994
78. Iqbal J, Sanger WG, Horsman DE, Rosenwald A, Pickering DL, Dave B, Dave S, Xiao L, Cao K, Zhu Q, Sherman S, Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Ott G, Müller-Hermelink HK, Delabie J, Braziel RM, Jaffe ES, Campo E, Lynch JC, Connors JM, Vose JM, Armitage JO, Grogan TM, Staudt LM, Chan WC (2004) BCL2 translocation defines a unique tumor subset within the germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Pathol* 165:159–166
79. Jain A, Jain SK (2008) PEGylation: an approach for drug delivery. A review. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 25:403–447
80. Johnston RJ, Poholek AC, DiToro D, Yusuf I, Eto D, Barnett B, Dent AL, Craft J, Crotty S (2009) Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation. *Science* 325:1006–1010
81. Junghans RP, Anderson CL (1996) The protection receptor for IgG catabolism is the beta2-microglobulin-containing neonatal intestinal transport receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:5512–5516
82. Kamionka M (2011) Engineering of Therapeutic Proteins Production in *Escherichia coli*. *Curr Pharm Biotechnol* 12:268–274
83. Kantarjian H, Stein A, Gokbuget N, Fielding AK, Schuh AC, Ribera JM, Wei A, Dombret H, Foa R, Bassan R, Arslan O, Sanz MA, Bergeron J, Demirkan F, Lech-Maranda E, Rambaldi A, Thomas X, Horst HA, Bruggemann M, Klapper W, Wood BL, Fleishman A, Nagorsen D, Holland C, Zimmerman Z, Topp MS (2017) Blinatumomab versus Chemotherapy for Advanced Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med* 376:836–847
84. Kapoor I, Li Y, Sharma A, Zhu H, Bodo J, Xu W, Hsi ED, Hill BT, Almasan A (2019) Resistance to BTK inhibition by ibrutinib can be overcome by preventing FOXO3a nuclear export and PI3K/AKT activation in B-cell lymphoid malignancies. *Cell Death Dis* 10:924
85. Karube K, Campo E (2015) MYC alterations in diffuse large B-cell lymphomas. *Semin Hematol* 52:97–106
86. Katzmann JA, Clark RJ, Abraham RS, Bryant S, Lymp JF, Bradwell AR, Kyle RA (2002) Serum Reference Intervals and Diagnostic Ranges for Free  $\kappa$  and Free  $\lambda$  Immunoglobulin Light Chains: Relative Sensitivity for Detection of Monoclonal Light Chains. *Clin Chem* 48:1437–1444
87. Kay BK, Winter J, McCafferty J (1996) Phage display of peptides and proteins : a laboratory manual. Academic Press, San Diego

88. Klyuchnikov E, Bacher U, Kroll T, Shea TC, Lazarus HM, Bredeson C, Fenske TS (2014) Allogeneic hematopoietic cell transplantation for diffuse large B cell lymphoma: who, when and how? *Bone Marrow Transplant* 49:1–7
89. Kochenderfer JN, Dudley ME, Kassim SH, Somerville RPT, Carpenter RO, Stetler-Stevenson M, Yang JC, Phan GQ, Hughes MS, Sherry RM, Raffeld M, Feldman S, Lu L, Li YF, Ngo LT, Goy A, Feldman T, Spaner DE, Wang ML, Chen CC, Kranick SM, Nath A, Nathan D-AN, Morton KE, Toomey MA, Rosenberg SA (2015) Chemotherapy-refractory diffuse large B-cell lymphoma and indolent B-cell malignancies can be effectively treated with autologous T cells expressing an anti-CD19 chimeric antigen receptor. *J Clin Oncol* 33:540–549
90. Köhler G, Milstein C (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256:495–497
91. Küppers R (2005) Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer* 5:251–262
92. Kutok JL, Wang F (2006) Spectrum of Epstein-Barr virus-associated diseases. *Annu Rev Pathol* 1:375–404
93. Leach DR, Krummel MF, Allison JP (1996) Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* 271:1734–1736
94. Lee DW, Gardner R, Porter DL, Louis CU, Ahmed N, Jensen M, Grupp SA, Mackall CL (2014) Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome. *Blood* 124:188–195
95. Lee DW, Santomasso BD, Locke FL, Ghobadi A, Turtle CJ, Brudno JN, Maus MV, Park JH, Mead E, Pavletic S, Go WY, Eldjerou L, Gardner RA, Frey N, Curran KJ, Peggs K, Pasquini M, DiPersio JF, van den Brink MRM, Komanduri KV, Grupp SA, Neelapu SS (2019) ASTCT Consensus Grading for Cytokine Release Syndrome and Neurologic Toxicity Associated with Immune Effector Cells. *Biol Blood Marrow Transplant* 25:625–638
96. Leonard JP, Kolibaba KS, Reeves JA, Tulpule A, Flinn IW, Kolevska T, Robles R, Flowers CR, Collins R, DiBella NJ, Papish SW, Venugopal P, Horodner A, Tabatabai A, Hajdenberg J, Park J, Neuwirth R, Mulligan G, Suryanarayan K, Esseltine DL, de Vos S (2017) Randomized Phase II Study of R-CHOP With or Without Bortezomib in Previously Untreated Patients With Non-Germinal Center B-Cell-Like Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol* 35:3538–3546
97. Lister TA, Crowther D, Sutcliffe SB, Glatstein E, Canellos GP, Young RC, Rosenberg SA, Coltman CA, Tubiana M (1989) Report of a committee convened to discuss the evaluation and staging of patients with Hodgkin's disease: Cotswolds meeting. *J Clin Oncol* 7:1630–1636
98. Liu YJ, Joshua DE, Williams GT, Smith CA, Gordon J, MacLennan IC (1989) Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres. *Nature* 342:929–931
99. Liu YJ, Malisan F, de Bouteiller O, Guret C, Lebecque S, Banchereau J, Mills FC, Max EE, Martinez-Valdez H (1996) Within Germinal Centers, Isotype Switching of Immunoglobulin Genes Occurs after the Onset of Somatic Mutation. *Immunity* 4:241–250
100. Löffler A, Kufer P, Lutterbüse R, Zettl F, Daniel PT, Schwenkenbecher JM, Riethmüller G, Dörken B, Bargou RC (2000) A recombinant bispecific single-chain antibody, CD19 x CD3, induces rapid and high lymphoma-directed cytotoxicity by unstimulated T lymphocytes. *Blood* 95:2098–2103
101. Lowe D, Dudgeon K, Rouet R, Schofield P, Jermutus L, Christ D (2011) Aggregation, stability, and formulation of human antibody therapeutics. *Adv Protein Chem Struct Biol* 84:41–61
102. Ma WW, Adjei AA (2009) Novel agents on the horizon for cancer therapy. *CA Cancer J Clin* 59:111–137
103. MacLennan IC (1994) Germinal centers. *Annu Rev Immunol* 12:117–139
104. Mager DE, Jusko WJ (2001) General Pharmacokinetic Model for Drugs Exhibiting Target-Mediated Drug Disposition. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 28:507–532

105. Maloney DG, Grillo-López AJ, White CA, Bodkin D, Schilder RJ, Neidhart JA, Janakiraman N, Foon KA, Liles T-M, Dallaire BK, Wey K, Royston I, Davis T, Levy R (1997) IDEC-C2B8 (Rituximab) Anti-CD20 Monoclonal Antibody Therapy in Patients With Relapsed Low-Grade Non-Hodgkin's Lymphoma. *Blood* 90:2188–2195
106. Marcus R, Davies A, Ando K, Klapper W, Opat S, Owen C, Phillips E, Sangha R, Schlag R, Seymour JF, Townsend W, Trneny M, Wenger M, Fingerle-Rowson G, Rufibach K, Moore T, Herold M, Hiddemann W (2017) Obinutuzumab for the First-Line Treatment of Follicular Lymphoma. *N Engl J Med* 377:1331–1344
107. Marriott JB, Clarke IA, Dredge K, Muller G, Stirling D, Dalglish AG (2002) Thalidomide and its analogues have distinct and opposing effects on TNF-alpha and TNFR2 during co-stimulation of both CD4(+) and CD8(+) T cells. *Clin Exp Immunol* 130:75–84
108. McLaughlin P, Grillo-López AJ, Link BK, Levy R, Czuczman MS, Williams ME, Heyman MR, Bence-Bruckler I, White CA, Cabanillas F, Jain V, Ho AD, Lister J, Wey K, Shen D, Dallaire BK (1998) Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol* 16:2825–2833
109. Mellekjaer L, Linet MS, Gridley G, Frisch M, Møller H, Olsen JH (1996) Rheumatoid arthritis and cancer risk. *Eur J Cancer* 32A:1753–1757
110. Mellekjaer L, Andersen V, Linet MS, Gridley G, Hoover R, Olsen JH (1997) Non-Hodgkin's lymphoma and other cancers among a cohort of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 40:761–768
111. Merouani A, Shpall EJ, Jones RB, Archer PG, Schrier RW (1996) Renal function in high dose chemotherapy and autologous hematopoietic cell support treatment for breast cancer. *Kidney Int* 50:1026–1031
112. Mileshkin LR, Seymour JF, Wolf MM, Gates P, Januszewicz EH, Joyce P, Prince HM (2005) Cardiovascular toxicity is increased, but manageable, during high-dose chemotherapy and autologous peripheral blood stem cell transplantation for patients aged 60 years and older. *Leuk Lymphoma* 46:1575–1579
113. Monni O, Joensuu H, Franssila K, Klefstrom J, Alitalo K, Knuutila S (1997) BCL2 overexpression associated with chromosomal amplification in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 90:1168–1174
114. Murphy K, Weaver C (2018) Die Entstehung von Antigenrezeptoren in Lymphocyten. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg
115. Murphy K, Weaver C (2018) Antigenerkennung durch B-Zell- und T-Zell-Rezeptoren. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg
116. Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, Lekakis LJ, Miklos DB, Jacobson CA, Braunschweig I, Oluwole OO, Siddiqi T, Lin Y, Timmerman JM, Stiff PJ, Friedberg JW, Flinn IW, Goy A, Hill BT, Smith MR, Deol A, Farooq U, McSweeney P, Munoz J, Avivi I, Castro JE, Westin JR, Chavez JC, Ghobadi A, Komanduri KV, Levy R, Jacobsen ED, Witzig TE, Reagan P, Bot A, Rossi J, Navale L, Jiang Y, Aycock J, Elias M, Chang D, Wieszorek J, Go WY (2017) Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med* 377:2531–2544
117. Neelapu SS, Tummala S, Kebriaei P, Wierda W, Gutierrez C, Locke FL, Komanduri KV, Lin Y, Jain N, Daver N, Westin J, Gulbis AM, Loghin ME, de Groot JF, Adkins S, Davis SE, Rezvani K, Hwu P, Shpall EJ (2018) Chimeric antigen receptor T-cell therapy - assessment and management of toxicities. *Nat Rev Clin Oncol* 15:47–62
118. Neelapu SS, Jacobson CA, Oluwole OO, Munoz J, Deol A, Miklos DB, Bartlett NL, Braunschweig I, Jiang Y, Kim JJ, Zheng L, Rossi JM, Locke FL (2020) Outcomes of older patients in ZUMA-1, a pivotal study of axicabtagene ciloleucel in refractory large B-cell lymphoma. *Blood* 135:2106–2109

119. Ngo VN, Davis RE, Lamy L, Yu X, Zhao H, Lenz G, Lam LT, Dave S, Yang L, Powell J, Staudt LM (2006) A loss-of-function RNA interference screen for molecular targets in cancer. *Nature* 441:106–110
120. Ngo VN, Young RM, Schmitz R, Jhavar S, Xiao W, Lim K-H, Kohlhammer H, Xu W, Yang Y, Zhao H, Shaffer AL, Romesser P, Wright G, Powell J, Rosenwald A, Muller-Hermelink HK, Ott G, Gascoyne RD, Connors JM, Rimsza LM, Campo E, Jaffe ES, Delabie J, Smeland EB, Fisher RI, Braziel RM, Tubbs RR, Cook JR, Weisenburger DD, Chan WC, Staudt LM (2011) Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature* 470:115–119
121. Nurieva RI, Chung Y, Martinez GJ, Yang XO, Tanaka S, Matskevitch TD, Wang Y-H, Dong C (2009) Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. *Science* 325:1001–1005
122. Owen CJ, Stewart DA (2015) Obinutuzumab for the treatment of patients with previously untreated chronic lymphocytic leukemia: overview and perspective. *Ther Adv Hematol* 6:161–170
123. Ozdoğan O, Ratip S, Ahdab YA, Dane F, Ahdab HA, Imeryüz N, Tözün N (2003) Causes and risk factors for liver injury following bone marrow transplantation. *J Clin Gastroenterol* 36:421–426
124. Pardoll DM (2012) The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 12:252–264
125. Parker DC (1993) T cell-dependent B cell activation. *Annu Rev Immunol* 11:331–360
126. Pasqualucci L, Neumeister P, Goossens T, Nanjangud G, Chaganti RS, Küppers R, Dalla-Favera R (2001) Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature* 412:341–346
127. Pasqualucci L, Dalla-Favera R (2018) Genetics of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 131:2307–2319
128. Pastan I, FitzGerald D (1989) Pseudomonas exotoxin: chimeric toxins. *J Biol Chem* 264:15157–15160
129. Pfreundschuh M, Trümper L, Osterborg A, Pettengell R, Trneny M, Imrie K, Ma D, Gill D, Walewski J, Zinzani P-L, Stahel R, Kvaloy S, Shpilberg O, Jaeger U, Hansen M, Lehtinen T, López-Guillermo A, Corrado C, Scheliga A, Milpied N, Mendila M, Rashford M, Kuhnt E, Loeffler M, MabThera International Trial Group (2006) CHOP-like chemotherapy plus rituximab versus CHOP-like chemotherapy alone in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: a randomised controlled trial by the MabThera International Trial (MInT) Group. *Lancet Oncol* 7:379–391
130. Pfreundschuh M, Schubert J, Ziepert M, Schmits R, Mohren M, Lengfelder E, Reiser M, Nickenig C, Clemens M, Peter N, Bokemeyer C, Eimermacher H, Ho A, Hoffmann M, Mertelsmann R, Trümper L, Balleisen L, Liersch R, Metzner B, Hartmann F, Glass B, Poeschel V, Schmitz N, Ruebe C, Feller AC, Loeffler M, German High-Grade Non-Hodgkin Lymphoma Study Group (DSHNHL) (2008) Six versus eight cycles of bi-weekly CHOP-14 with or without rituximab in elderly patients with aggressive CD20+ B-cell lymphomas: a randomised controlled trial (RICOVER-60). *Lancet Oncol* 9:105–116
131. Philip T, Guglielmi C, Hagenbeek A, Somers R, Van der Lelie H, Bron D, Sonneveld P, Gisselbrecht C, Cahn JY, Harousseau JL (1995) Autologous bone marrow transplantation as compared with salvage chemotherapy in relapses of chemotherapy-sensitive non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 333:1540–1545
132. Pieper K, Grimbacher B, Eibel H (2013) B-cell biology and development. *J Allergy Clin Immunol* 131:959–971

133. Poeschel V, Held G, Ziepert M, Altmann B, Witzens-Harig M, Holte H, Thurner L, Viardot A, Borchmann P, Kanz L, Keller U, Schmidt C, Mahlberg R, Metzner B, Marks R, Hoeffkes H-G, Christofyllakis K, Amam J, Berdel C, Stilgenbauer S, Schmitz N, Truemper L, Murawski N, Loeffler M, Pfreundschuh M (2018) Excellent Outcome of Young Patients (18-60 years) with Favourable-Prognosis Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL) Treated with 4 Cycles CHOP Plus 6 Applications of Rituximab: Results of the 592 Patients of the Flyer Trial of the Dshnhl/GLA. *Blood* 132:781–781
134. Polson AG, Calemine-Fenaux J, Chan P, Chang W, Christensen E, Clark S, de Sauvage FJ, Eaton D, Elkins K, Elliott JM, Frantz G, Fuji RN, Gray A, Harden K, Ingle GS, Kljavin NM, Koeppen H, Nelson C, Prabhu S, Raab H, Ross S, Slaga DS, Stephan J-P, Scales SJ, Spencer SD, Vandlen R, Wranik B, Yu S-F, Zheng B, Ebens A (2009) Antibody-drug conjugates for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma: target and linker-drug selection. *Cancer Res* 69:2358–2364
135. Preud'homme JL, Petit I, Barra A, Morel F, Lecron JC, Lelièvre E (2000) Structural and functional properties of membrane and secreted IgD. *Mol Immunol* 37:871–887
136. Rajkumar SV, Hayman SR, Lacy MQ, Dispenzieri A, Geyer SM, Kabat B, Zeldenrust SR, Kumar S, Greipp PR, Fonseca R, Lust JA, Russell SJ, Kyle RA, Witzig TE, Gertz MA (2005) Combination therapy with lenalidomide plus dexamethasone (Rev/Dex) for newly diagnosed myeloma. *Blood* 106:4050–4053
137. Rigacci L, Puccini B, Doderio A, Iacopino P, Castagna L, Bramanti S, Ciceri F, Fanin R, Rambaldi A, Falda M, Milone G, Guidi S, Martelli MF, Mazza P, Oneto R, Bosi A, Gruppo Italiano Trapianto di Midollo Osseo (GITMO) (2012) Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with diffuse large B cell lymphoma relapsed after autologous stem cell transplantation: a GITMO study. *Ann Hematol* 91:931–939
138. Rogers J, Wall R (1984) Immunoglobulin RNA rearrangements in B lymphocyte differentiation. *Adv Immunol* 35:39–59
139. Rogers LM, Veeramani S, Weiner GJ (2014) Complement in monoclonal antibody therapy of cancer. *Immunol Res* 59:203–210
140. Sagiv-Barfi I, Kohrt HEK, Czerwinski DK, Ng PP, Chang BY, Levy R (2015) Therapeutic antitumor immunity by checkpoint blockade is enhanced by ibrutinib, an inhibitor of both BTK and ITK. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:E966-972
141. Saiz A, Graus F (2004) Neurological complications of hematopoietic cell transplantation. *Semin Neurol* 24:427–434
142. Salles G, Duell J, Barca EG, Tournilhac O, Jurczak W, Liberati AM, Nagy Z, Obr A, Gaidano G, André M, Kalakonda N, Dreyling M, Weirather J, Dirnberger-Hertweck M, Ambarkhane S, Fingerle-Rowson G, Maddocks K (2020) Tafasitamab plus lenalidomide in relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma (L-MIND): a multicentre, prospective, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol* 21:978–988
143. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270:467–470
144. Scherrmann JM, Terrien N, Urtizberea M, Pierson P, Denis H, Bourre JM (1989) Immunotoxicotherapy: present status and future trends. *J Toxicol Clin Toxicol* 27:1–35
145. Schmitz N, Nickelsen M, Ziepert M, Haenel M, Borchmann P, Schmidt C, Viardot A, Bentz M, Peter N, Ehninger G, Doelken G, Ruebe C, Truemper L, Rosenwald A, Pfreundschuh M, Loeffler M, Glass B, German High-Grade Lymphoma Study Group (DSHNHL) (2012) Conventional chemotherapy (CHOEP-14) with rituximab or high-dose chemotherapy (MegaCHOEP) with rituximab for young, high-risk patients with aggressive B-cell lymphoma: an open-label, randomised, phase 3 trial (DSHNHL 2002-1). *Lancet Oncol* 13:1250–1259

146. Schuster SJ, Svoboda J, Chong EA, Nasta SD, Mato AR, Anak O, Brogdon JL, Pruteanu-Malinici I, Bhoj V, Landsburg D, Wasik M, Levine BL, Lacey SF, Melenhorst JJ, Porter DL, June CH (2017) Chimeric Antigen Receptor T Cells in Refractory B-Cell Lymphomas. *N Engl J Med* 377:2545–2554
147. Schuster SJ, Bishop MR, Tam CS, Waller EK, Borchmann P, McGuirk JP, Jager U, Jaglowski S, Andreadis C, Westin JR, Fleury I, Bachanova V, Foley SR, Ho PJ, Mielke S, Magenau JM, Holte H, Pantano S, Pacaud LB, Awasthi R, Chu J, Anak O, Salles G, Maziarz RT, Juliet Investigators (2019) Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med* 380:45–56
148. Seetharam S, Chaudhary VK, FitzGerald D, Pastan I (1991) Increased cytotoxic activity of *Pseudomonas* exotoxin and two chimeric toxins ending in KDEL. *J Biol Chem* 266:17376–17381
149. Sehn LH, Donaldson J, Chhanabhai M, Fitzgerald C, Gill K, Klasa R, MacPherson N, O'Reilly S, Spinelli JJ, Sutherland J, Wilson KS, Gascoyne RD, Connors JM (2005) Introduction of combined CHOP plus rituximab therapy dramatically improved outcome of diffuse large B-cell lymphoma in British Columbia. *J Clin Oncol* 23:5027–5033
150. Sehn LH, Herrera AF, Flowers CR, Kamdar MK, McMillan A, Hertzberg M, Assouline S, Kim TM, Kim WS, Ozcan M, Hirata J, Penuel E, Paulson JN, Cheng J, Ku G, Matasar MJ (2020) Polatuzumab Vedotin in Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol* 38:155–165
151. Seymour JF, Kipps TJ, Eichhorst B, Hillmen P, D'Rozario J, Assouline S, Owen C, Gerecitano J, Robak T, De la Serna J, Jaeger U, Cartron G, Montillo M, Humerickhouse R, Punnoose EA, Li Y, Boyer M, Humphrey K, Mobasher M, Kater AP (2018) Venetoclax-Rituximab in Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med* 378:1107–1120
152. Shen HM, Peters A, Baron B, Zhu X, Storb U (1998) Mutation of BCL-6 gene in normal B cells by the process of somatic hypermutation of Ig genes. *Science* 280:1750–1752
153. Shen J, Zhu Z (2008) Catumaxomab, a rat/murine hybrid trifunctional bispecific monoclonal antibody for the treatment of cancer. *Curr Opin Mol Ther* 10:273–284
154. Singh S, Kumar NK, Dwiwedi P, Charan J, Kaur R, Sidhu P, Chugh VK (2018) Monoclonal Antibodies: A Review. *Curr Clin Pharmacol* 13:85–99
155. Skerra A, Plückthun A (1988) Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science* 240:1038–1041
156. Smith A, Howell D, Patmore R, Jack A, Roman E (2011) Incidence of haematological malignancy by sub-type: a report from the Haematological Malignancy Research Network. *Br J Cancer* 105:1684–1692
157. Smith TW (1991) Review of clinical experience with digoxin immune Fab (ovine). *Am J Emerg Med* 9:1–6
158. Stansfeld AG, Diebold J, Noel H, Kapanci Y, Rilke F, Kelényi G, Sundstrom C, Lennert K, van Unnik JA, Mioduszevska O (1988) Updated Kiel classification for lymphomas. *Lancet* 1:292–293
159. Stilgenbauer S, Eichhorst B, Schetelig J, Coutre S, Seymour JF, Munir T, Puvvada SD, Wendtner CM, Roberts AW, Jurczak W, Mulligan SP, Bottcher S, Mobasher M, Zhu M, Desai M, Chyla B, Verdugo M, Enschede SH, Cerri E, Humerickhouse R, Gordon G, Hallek M, Wierda WG (2016) Venetoclax in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion: a multicentre, open-label, phase 2 study. *Lancet Oncol* 17:768–778
160. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, Advani R, Ghielmini M, Salles GA, Zelenetz AD, Jaffe ES (2016) The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 127:2375–2390

161. Thieblemont C, Tilly H, Gomes da Silva M, Casasnovas RO, Fruchart C, Morschhauser F, Haioun C, Lazarovici J, Grosicka A, Perrot A, Trotman J, Sebban C, Caballero D, Greil R, van Eygen K, Cohen AM, Gonzalez H, Bouabdallah R, Oberic L, Corront B, Choufi B, Lopez-Guillermo A, Catalano J, Van Hoof A, Briere J, Cabecadas J, Salles G, Gaulard P, Bosly A, Coiffier B (2017) Lenalidomide Maintenance Compared With Placebo in Responding Elderly Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated With First-Line Rituximab Plus Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone. *J Clin Oncol* 35:2473–2481
162. Thomas P, Smart TG (2005) HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. *J Pharmacol Toxicol Methods* 51:187–200
163. Thurner L, Preuss KD, Bewarder M, Kemele M, Fadle N, Regitz E, Altmeyer S, Schormann C, Poeschel V, Ziepert M, Walter S, Roth P, Weller M, Szczepanowski M, Klapper W, Monoranu C, Rosenwald A, Moller P, Hartmann S, Hansmann ML, Mackensen A, Schafer H, Schorb E, Illerhaus G, Buslei R, Bohle RM, Stilgenbauer S, Kim YJ, Pfreundschuh M (2018) Hyper-N-glycosylated SAMD14 and neurabin-I as driver autoantigens of primary central nervous system lymphoma. *Blood* 132:2744–2753
164. Thurner L, Hartmann S, Fadle N, Kemele M, Bock T, Bewarder M, Regitz E, Neumann F, Nimmegern A, von Muller L, Pott C, Kim YJ, Bohle RM, Wasik M, Schuster SJ, Hansmann ML, Preuss KD, Pfreundschuh M (2019) LRPAP1 is a frequent proliferation-inducing antigen of BCRs of mantle cell lymphomas and can be used for specific therapeutic targeting. *Leukemia* 33:148–158
165. Thurner L, Hartmann S, Bewarder M, Fadle N, Regitz E, Schormann C, Quiroga N, Kemele M, Klapper W, Rosenwald A, Trumper L, Bohle RM, Nimmegern A, Korbel C, Laschke MW, Menger MD, Barth S, Kubuschok B, Mottok A, Kaddu-Mulindwa D, Hansmann ML, Poeschel V, Held G, Murawski N, Stilgenbauer S, Neumann F, Preuss KD, Pfreundschuh M (2020) Identification of the atypically modified autoantigen Ars2 as the target of B-cell receptors from activated B cell-type diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica* ahead of print
166. Tonegawa S (1983) Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302:575–581
167. Tonegawa S (1987) [Molecular biology of immunologic recognition]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 32:239–250
168. Topalian SL, Sznol M, McDermott DF, Kluger HM, Carvajal RD, Sharfman WH, Brahmer JR, Lawrence DP, Atkins MB, Powderly JD, Leming PD, Lipson EJ, Puzanov I, Smith DC, Taube JM, Wigginton JM, Kollia GD, Gupta A, Pardoll DM, Sosman JA, Hodi FS (2014) Survival, durable tumor remission, and long-term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab. *J Clin Oncol* 32:1020–1030
169. Treon SP, Tripsas CK, Meid K, Warren D, Varma G, Green R, Argyropoulos KV, Yang G, Cao Y, Xu L, Patterson CJ, Rodig S, Zehnder JL, Aster JC, Harris NL, Kanan S, Ghobrial I, Castillo JJ, Laubach JP, Hunter ZR, Salman Z, Li J, Cheng M, Clow F, Graef T, Palomba ML, Advani RH (2015) Ibrutinib in Previously Treated Waldenström's Macroglobulinemia. *N Engl J Med* 372:1430–1440
170. Uckun FM, Jaszcz W, Ambrus JL, Fauci AS, Gajl-Peczalska K, Song CW, Wick MR, Myers DE, Waddick K, Ledbetter JA (1988) Detailed studies on expression and function of CD19 surface determinant by using B43 monoclonal antibody and the clinical potential of anti-CD19 immunotoxins. *Blood* 71:13–29
171. van Kampen RJW, Canals C, Schouten HC, Nagler A, Thomson KJ, Vernant J-P, Buzyn A, Boogaerts MA, Luan J-J, Maury S, Milpied NJ, Jouet J-P, Ossenkoppele GJ, Sureda A (2011) Allogeneic stem-cell transplantation as salvage therapy for patients with diffuse large B-cell non-Hodgkin's lymphoma relapsing after an autologous stem-cell transplantation: an analysis of the European Group for Blood and Marrow Transplantation Registry. *J Clin Oncol* 29:1342–1348
172. Vargesson N (2015) Thalidomide-induced teratogenesis: History and mechanisms. *Birth Defects Res* 105:140–156

173. Venkatachalam MA, Rennke HG (1978) The structural and molecular basis of glomerular filtration. *Circ Res* 43:337–347
174. Verma S, Miles D, Gianni L, Krop IE, Welslau M, Baselga J, Pegram M, Oh D-Y, Diéras V, Guardino E, Fang L, Lu MW, Olsen S, Blackwell K (2012) Trastuzumab Emtansine for HER2-Positive Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med* 367:1783–1791
175. Waldmann TA, Strober W (1976) *Metabolism of Immunoglobulins*. Elsevier, Amsterdam
176. Walport MJ (2001) Complement. First of two parts. *N Engl J Med* 344:1058–1066
177. Wang ML, Rule S, Martin P, Goy A, Auer R, Kahl BS, Jurczak W, Advani RH, Romaguera JE, Williams ME, Barrientos JC, Chmielowska E, Radford J, Stilgenbauer S, Dreyling M, Jędrzejczak WW, Johnson P, Spurgeon SE, Li L, Zhang L, Newberry K, Ou Z, Cheng N, Fang B, McGreivy J, Clow F, Buggy JJ, Chang BY, Beaupre DM, Kunkel LA, Blum KA (2013) Targeting BTK with Ibrutinib in Relapsed or Refractory Mantle-Cell Lymphoma. *N Engl J Med* 369:507–516
178. Wiernik PH, Lossos IS, Tuscano JM, Justice G, Vose JM, Cole CE, Lam W, McBride K, Wride K, Pietronigro D, Takeshita K, Ervin-Haynes A, Zeldis JB, Habermann TM (2008) Lenalidomide monotherapy in relapsed or refractory aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 26:4952–4957
179. Wilkes GM (2018) Targeted Therapy: Attacking Cancer with Molecular and Immunological Targeted Agents. *Asia-Pac J Oncol Nurs* 5:137–155
180. Wilson WH, Young RM, Schmitz R, Yang Y, Pittaluga S, Wright G, Lih C-J, Williams PM, Shaffer AL, Gerecitano J, de Vos S, Goy A, Kenkre VP, Barr PM, Blum KA, Shustov A, Advani R, Fowler NH, Vose JM, Elstrom RL, Habermann TM, Barrientos JC, McGreivy J, Fardis M, Chang BY, Clow F, Munneke B, Moussa D, Beaupre DM, Staudt LM (2015) Targeting B cell receptor signaling with ibrutinib in diffuse large B cell lymphoma. *Nat Med* 21:922–926
181. Witzig TE, Vose JM, Zinzani PL, Reeder CB, Buckstein R, Polikoff JA, Bouabdallah R, Haioun C, Tilly H, Guo P, Pietronigro D, Ervin-Haynes AL, Czuczman MS (2011) An international phase II trial of single-agent lenalidomide for relapsed or refractory aggressive B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol* 22:1622–1627
182. Worn A, Pluckthun A (2001) Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments. *J Mol Biol* 305:989–1010
183. Wotherspoon AC, Doglioni C, Diss TC, Pan L, Moschini A, de Boni M, Isaacson PG (1993) Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet* 342:575–577
184. Yang H, Zonder JA, Dou QP (2009) Clinical development of novel proteasome inhibitors for cancer treatment. *Expert Opin Investig Drugs* 18:957–971
185. Yokota T, Milenic DE, Whitlow M, Schlom J (1992) Rapid tumor penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms. *Cancer Res* 52:3402–3408
186. Younes A, Santoro A, Shipp M, Zinzani PL, Timmerman JM, Ansell S, Armand P, Fanale M, Ratanatharathorn V, Kuruvilla J, Cohen JB, Collins G, Savage KJ, Trneny M, Kato K, Farsaci B, Parker SM, Rodig S, Roemer MGM, Ligon AH, Engert A (2016) Nivolumab for classical Hodgkin's lymphoma after failure of both autologous stem-cell transplantation and brentuximab vedotin: a multicentre, multicohort, single-arm phase 2 trial. *Lancet Oncol* 17:1283–1294
187. Younes A, Sehn LH, Johnson P, Zinzani PL, Hong X, Zhu J, Patti C, Belada D, Samoiloova O, Suh C, Leppä S, Rai S, Turgut M, Jurczak W, Cheung MC, Gurion R, Yeh S-P, Lopez-Hernandez A, Dührsen U, Thieblemont C, Chiattoni CS, Balasubramanian S, Carey J, Liu G, Shreeve SM, Sun S, Zhuang SH, Vermeulen J, Staudt LM, Wilson W, PHOENIX investigators (2019) Randomized Phase III Trial of Ibrutinib and Rituximab Plus Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone in Non-Germinal Center B-Cell Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol* 37:1285–1295

188. Young RM, Wu T, Schmitz R, Dawood M, Xiao W, Phelan JD, Xu W, Menard L, Meffre E, Chan W-CC, Jaffe ES, Gascoyne RD, Campo E, Rosenwald A, Ott G, Delabie J, Rimsza LM, Staudt LM (2015) Survival of human lymphoma cells requires B-cell receptor engagement by self-antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:13447–13454
189. Zhang G, Gurtu V, Kain SR (1996) An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 227:707–711
190. Zhou Z, Sehn LH, Rademaker AW, Gordon LI, Lacasce AS, Crosby-Thompson A, Vanderplas A, Zelenetz AD, Abel GA, Rodriguez MA, Nademanee A, Kaminski MS, Czuczman MS, Millenson M, Niland J, Gascoyne RD, Connors JM, Friedberg JW, Winter JN (2014) An enhanced International Prognostic Index (NCCN-IPI) for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the rituximab era. *Blood* 123:837–842
191. Zinzani PL, Ribrag V, Moskowitz CH, Michot JM, Kuruvilla J, Balakumaran A, Zhang Y, Chlosta S, Shipp MA, Armand P (2017) Safety and tolerability of pembrolizumab in patients with relapsed/refractory primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood* 130:267–270

## **7. Publikationen/Danksagung**

### **7.1 Publikationen**

#### **Integration of the B-Cell Receptor Antigen Neurabin-I/SAMD14 Into an Antibody Format as New Therapeutic Approach for the Treatment of Primary CNS Lymphoma.**

Frontiers in Oncology 2020 Nov 12; 10:580364

Moritz Bewarder, Maximilian Kiefer, Clara Moelle, Lisa Goerens, Stephan Stilgenbauer, Konstantinos Christofyllakis, Dominic Kaddu-Mulindwa, Natalie Fadle, Evi Regitz, Frank Neumann, Markus Hoth, Klaus-Dieter Preuss, Michael Pfreundschuh and Lorenz Thurner

#### **The B-cell Receptor Auto-Antigen LRPAP1 can Replace Variable Regions to target Mantle Cell Lymphoma Cells in Different Antibody Formats**

Hemasphere major revision

Moritz Bewarder, Maximilian Kiefer, Helene Will, Kathrin Olesch, Clara Moelle, Stephan Stilgenbauer, Konstantinos Christofyllakis, Dominic Kaddu-Mulindwa, Joerg Thomas Bittenbring, Natalie Fadle, Evi Regitz, Markus Hoth, Frank Neumann, Klaus-Dieter Preuss, Michael Pfreundschuh and Lorenz Thurner

Geplant ist ebenfalls eine Publikation über die Integration des DLBCL-spezifischen B-Zell Rezeptor Antigen ARS2 in verschiedene Antikörper oder antikörperähnliche Therapieformate.

## 7.2 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Michael Pfreundschuh für die Überlassung des Themas meiner Doktorarbeit bedanken. Auch möchte ich mich bei Ihm für seine Unterstützung und sein Engagement bedanken.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Stephan Stilgenbauer für die Übernahme meiner Arbeit und die weitere Möglichkeit, diese an seiner Klinik zu verwirklichen.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Moritz Bewarder, der mich über die ganze Zeit meiner Arbeit persönlich betreut hat. Er stand mir stets mit gutem Rat zur Seite.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Dr. Klaus-Dieter Preuss, Frau Evi Regitz und Frau Natalie Fadle bedanken, die mich während meiner Arbeit im Labor stets unterstützt haben und ohne die mir diese Arbeit nicht gelungen wäre. Mein Dank gilt selbstverständlich auch allen anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des José-Carreras-Zentrum, die immer Zeit für meine Frage hatten und stets die Geduld hatten, mir zu helfen und mich zu unterstützen.

Auch möchte ich mich bei all meinen Freunden bedanken, die mir immer eine moralische Stütze waren und die mich ebenso immer ermutigt haben, auch in schweren Zeiten nicht den Mut und die Hoffnung zu verlieren.

Schließlich möchte ich mich nicht zuletzt auch bei meiner Familie, allen voran meinen beiden Eltern Karolin und Franz-Rudolf ganz herzlich für die jahrelange und bedingungslose Unterstützung bedanken, die sicherlich die Voraussetzung für das Gelingen dieser Arbeit waren. Ihnen möchte ich diese Arbeit widmen.

## **8. Lebenslauf**

Der Lebenslauf ist aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht Teil der online Fassung.



Tag der Promotion: 16.11.2021  
Ort: Homburg, Saarland  
Dekan: Univ.-Prof. Dr. Michael D. Menger  
Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Lorenz Thurner  
Prof. Dr. Norbert Graf