

Selektion, rekombinante Expression und molekulare Charakterisierung CD38-spezifischer Einzeldomänen-Antikörper

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Julia Koenigsdorf
aus Marburg

Hamburg 2016

Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am 20.01.2017.

Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Friedrich Koch-Nolte

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Stefan Linder

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Friedrich Koch-Nolte für die Überlassung der interessanten Aufgabenstellung und die fürsorgliche Betreuung in allen Phasen der Arbeit. Dankbar bin ich ebenfalls meinem Betreuer Herrn PD. Dr. Peter Bannas für die umfassende Förderung und Anleitung zum selbstständigen wissenschaftlichen Arbeiten. Herrn Prof. Dr. Stefan Linder danke ich sehr für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ich danke Stefan Menzel für verlässliche Unterstützung bei der experimentellen Arbeit, insbesondere beim Phagen-Display und für die Hilfe beim Entwerfen des Expressionskonstrukts für Daratumumab sowie für die durchgeführten Sequenzanalysen der Primärbibliotheken, Mandy Unger danke ich für die Sequenzanalysen der VHHs aus den Lamas 10 und 25. Mein Dank für die Einarbeitung gilt vor allem Joanna Schmid und Valentin Kunick. Dem gesamten Team des Instituts für Immunologie danke ich für hilfreiche Ratschläge, interessante Gespräche und die nette Laboratmosphäre.

Mein privater Dank gilt meinem Ehemann Alexander und meinen Eltern.

Für Alex

Zusammenfassung

Die antikörperbasierte Krebsimmuntherapie ist in den letzten Jahren ein bedeutender Bestandteil der Diagnostik und Behandlung vieler Krebserkrankungen geworden. Die B-Zell-Erkrankungen der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) und des multiplen Myeloms (MM), welches eine 5-Jahres-Überlebensrate von unter 50 % hat, sind noch immer unheilbare Erkrankungen. Das multifunktionale, als Enzym und Rezeptor fungierende CD38 wird beim MM hochexprimiert und bezüglich der CLL als prognostischer Marker verwendet, dessen Vorkommen als kausal für die Pathogenese erkannt wurde. CD38-spezifische, konventionelle Antikörper zeigen in aktuellen klinischen Studien durch die Induktion von Prozessen der Immunabwehr erfolgversprechende Ergebnisse, insbesondere durch komplementabhängige Zytolyse (CDC). Einzeldomänen-Antikörper (VHHs) haben gegenüber konventionellen Antikörpern Vorteile, die ihre hohe Stabilität, größenbedingt rasche Verteilung und tiefe Penetration von dichten Geweben betreffen.

Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit CD38-spezifische VHHs selektioniert, bezüglich ihrer Affinität und ihres Epitops charakterisiert und in ein zur Auslösung von Immunantworten befähigtes Format umklont. Für diese Zielsetzung wurden im Vorfeld vier Lamas immunisiert. Aus den erstellten Phagenbibliotheken konnten im Rahmen dieser Arbeit sieben CD38-spezifische VHH-Familien isoliert werden. Für eine optimierte Expression sowie die Fusionierung mit C-terminalen Fc-tags erfolgte die Umklonierung von 15 VHH-Familien in einen eukaryotischen Expressionsvektor und ihre erfolgreiche Produktion als VHH und VHH-Fc-Fusionsprotein. Die VHHs wurden bezüglich der Spezifität und Affinität für ihr Zielantigen analysiert, und insgesamt neun der VHH-Familien konnten als hochaffin eingestuft werden, darunter vier neu selektionierte. Die Zugehörigkeit der VHHs zu drei verschiedenen Epitopen konnte ermittelt werden, von denen zwei durch Röntgenstrukturanalyse bereits lokalisiert wurden. Mit der Überführung des klinisch erprobten, monoklonalen Antikörpers Daratumumab in ein Einzelketten-Variablen-Fragment (scFv) mit fusioniertem humanem IgG-Fc-Anteil konnte das Potenzial zur CDC-Auslösung auf dieses Format übertragen und als Maßstab für die Erfassung der zytotoxischen Eigenschaften der VHH-Fc-Proteine genutzt werden. In vitro zeigten die VHH-Fc-Fusionsproteine eine Induktion von CDC an murinen Zelllinien.

Abstract

Targeted immunotherapy with monoclonal antibodies has become an important part of diagnosis and successful therapy for a number of cancers. Chronic lymphocytic leukemia and multiple myeloma which has a 5-year survival rate below 50 % are B cell lineage malignancies that remain incurable diseases. CD38 with its dual role as enzyme and receptor is highly expressed on myeloma cells and used as a marker of unfavorable prognosis in leukemia. It is also thought to be causal in the pathogenesis of the diseases. The CD38 targeted, conventional antibodies show encouraging results in recent studies by induction of immune responses. The effect is mostly based on complement-dependent cytotoxicity (CDC) that is triggered by the Fc portion. In comparison with common antibodies single domain antibodies (VHHs) display many advantages like high stability and better permeability in tissues due to their small size.

Therefore, the goal of this study was to select hCD38-specific VHHs and generate them as recombinant VHH-Fc fusion proteins with the ability to initiate immune responses. For this purpose, phage display libraries had been generated from four immunized llamas previously. In this study seven hCD38-specific VHH-families could be isolated. In order to optimize expression in serum-free cultivated HEK-293-6e-cells and reformat the VHHs with different Fc-tags a total of 15 VHH-families were subcloned in a eukaryotic expression vector and produced successfully as VHHs and VHH-Fc fusion proteins. The recombinant VHHs were characterized in terms of specificity and affinity to their target and ten hCD38-specific families of VHHs were found to show high affinity, four of them selected in this study. The binding to three different epitopes could be recognized, two of them already visualized by X-ray crystallography.

By subcloning VH and VL domains of the conventional antibody Daratumumab as scFv-Fc fusion protein it was possible to transfer the CDC activity to this format and use it as a standard. In an in vitro setting with murine cells the hCD38-specific VHH-Fc fusion proteins showed the ability to induce CDC.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	III
Zusammenfassung	V
Abstract	VI
Inhaltsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 CD38	1
1.1.1 Struktur	2
1.1.2 Funktion als Enzym und Rezeptor	3
1.1.3 CD38 im Rahmen hämatologischer Erkrankungen.....	7
1.1.3.1 Chronische lymphatische Leukämie	8
1.1.3.2 Multiple Myelome.....	9
1.2 Antikörperbasierte Krebsimmuntherapie	11
1.2.1 Direkte Antikörperwirkung	12
1.2.2 Komplementabhängige Zytolyse (Complement Dependent Cytolysis, CDC)	13
1.2.3 Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity, ADCC)	15
1.2.4 Komplementabhängige zellvermittelte Zytolyse (Complement Dependent Cellular Cytolysis, CDCC)	16
1.2.5 CD38 als Target.....	16
1.3 Schwereketten-Antikörper.....	19
1.3.1 Herstellung von CD38-spezifischen VHHs aus den Lamas 10, 25, 538 und 539	22
1.4 Zielsetzung	24
2 Material	25
2.1 Laborgeräte	25
2.2 Reagenzsysteme	27
2.3 Chemikalien.....	27
2.4 Medien.....	29
2.5 Puffer.....	29
2.6 Pro- und Eukaryotische Zelllinien.....	30
2.7 Antikörper	31
2.8 Enzyme	31
2.9 Vektoren	32
2.10 Affinitätsmatrizes	32

2.11	Protein- und DNA-Größenstandards	32
2.12	Oligonukleotide	32
3	Methoden	33
3.1	Molekularbiologische Methoden.....	33
3.1.1	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	33
3.1.2	Agarose-Gelelektrophorese	33
3.1.3	Extraktion von DNA aus Agarosegelen	34
3.1.4	Quantifizierung von Nukleinsäuren	34
3.1.5	DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen.....	34
3.1.6	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten.....	35
3.1.7	Ligation von DNA-Fragmenten.....	35
3.1.8	DNA-Sequenzierung	35
3.1.9	Transformation kompetenter <i>E.coli</i> -Zellen.....	35
3.1.10	Kultivierung von Bakterien und Lagerung von Bakterien-Kolonien	36
3.1.11	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien mit kommerziell erhältlichen Kits ..	36
3.2	Phagen-Display-Technologie	36
3.2.1	Prinzip des Phagen-Displays	36
3.2.2	Selektion an Antigen-exprimierenden Zellen	36
3.2.3	Reinfektion.....	37
3.2.4	Amplifikation selektierter Phagen	37
3.2.5	Produktion von Phagenbibliotheken	38
3.3	Proteinbiochemische Methoden.....	38
3.3.1	Periplasmatische Expression in <i>E.coli</i>	38
3.3.2	Aufreinigung von Periplasmalysaten	39
3.3.3	Quantifizierung von Proteinen	39
3.3.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	39
3.3.5	Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung von SDS-PAGE-Gelen	40
3.3.6	Fluorochromkonjugation an Antikörpern.....	40
3.4	Zellbiologische Methoden	40
3.4.1	Kultivieren und Passagieren von Zellen	40
3.4.2	Zellzahlbestimmung mit der Neubauer-Zählkammer	41
3.4.3	Transfektion und transiente Expression in HEK293-6E-Zellen	41
3.4.4	Aufreinigung von HEK293-6E-Zellüberständen mittels Ni-NTA-Säulen	41
3.4.5	Aufreinigung von HEK293-6E-Zellüberständen mittels Protein-G-Säule	42
3.5	Immunologische Methoden.....	42
3.5.1	Durchflusszytometrie (FACS).....	42
3.5.2	Spezifitäts-Assay	43

3.5.3	Affinitäts-Assay	43
3.5.4	Enzyminhibitions-Assay	43
3.5.5	Kreuzblockade-Assays.....	43
3.5.6	CDC-Assays	44
4	Ergebnisse.....	45
4.1	Selektion, Sequenzierung, Produktion und Affinitätsreinigung human CD38- spezifischer VHHs	45
4.1.1	Selektion der Phagenbibliotheken der Lamas 538 und 539.....	45
4.1.2	Expression der VHHs in <i>E.coli</i>	48
4.1.3	Spezifität der selektionierten VHHs für CD38.....	50
4.1.4	VHHs aus Lama 538 und 539	51
4.1.4.1	VHHs aus Lama 10 und 25.....	53
4.1.4.2	Die VHHs aus den Lamas 10, 25, 538 und 539 zeigen keine Spezifität für murines CD38	55
4.1.4.3	Zur Weiterarbeit ausgewählte Repräsentanten der VHH-Familien	55
4.1.5	Umklonierung in den Vektor pCSE2.5 und Expression in HEK293-6E-Zellen ..	57
4.1.5.1	Umklonierung	57
4.1.5.2	Transfektion.....	59
4.1.5.3	Affinitätsaufreinigung	61
4.2	Analyse der Bindungsstabilität und Epitope CD38-spezifischer VHHs	62
4.2.1	Analyse der Bindungsstabilität durch VHH-Titration	62
4.2.2	Die VHHs zeigen keine Hemmung der Glykohydrolase-Aktivität	65
4.2.3	Epitopkartierung.....	66
4.3	Vergleichende Analyse Daratumumabs und CD38-spezifischer VHHs bezüglich der Bindungsepitope und der Zytotoxizität	71
4.3.1	Produktion eines hCD38-spezifischen scFv-Fc-Fusionsproteins	71
4.3.2	Epitopanalyse von Daratumumab	73
4.3.3	CDC-Aktivität der selektierten VHHs und des scFv-Fc Fusionsproteins	76
5	Diskussion.....	85
5.1	Auswirkung der Immunisierungsstrategien	86
5.2	Optimierte Produktion	87
5.3	Einflussfaktoren auf die Affinität.....	88
5.4	Auswirkungen der Epitopzugehörigkeit	90
5.5	CDC-Aktivität	94
5.6	Ausblick	95
6	Anhang.....	97
6.1	Plasmidkarten.....	97

6.2	Sequenzen der selektierten VHHs aus den Lamas 10, 25, 538 und 539.....	98
6.3	Sequenzvergleich mit der Primärbibliothek	99
	Literaturverzeichnis	100
	Abkürzungsverzeichnis	115

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Struktur von CD38. (A) Van der Waals Oberfläche.....	3
Abb. 1.2: Durch CD38 katalysierte Reaktionen. (A) Hydrolyse von NAD ⁺ zu ADPR sowie Zykklase zu cADPR unter neutralen bis alkalischen pH-Bedingungen	4
Abb. 1.3: CD38 als Enzym und Rezeptor.	7
Abb. 1.4: CD38 in der Pathogenese der CLL.....	9
Abb. 1.5: CD38 in der Pathogenese des MM.....	11
Abb. 1.6: Schematische Darstellung des Mechanismus der komplementabhängigen Zytolyse (Complement Dependent Cytolysis, CDC).	14
Abb. 1.7: Schematische Darstellung des Mechanismus der antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity, ADCC)	15
Abb. 1.8: Bindungsepitop Daratumumabs	17
Abb. 1.9: Vergleich der Strukturen von konventionellen Antikörpern und Schwereketten- Antikörpern.....	20
Abb. 1.10: Strukturelle Besonderheiten von VHHs	21
Abb. 1.11: Immunisierungsschemata.....	23
Abb. 4.1: Expression von CD38 auf humanen CA46- und U266-Zellen	46
Abb. 4.2: Aminosäuresequenzen der intakten Klone aus den VHH-Bibliotheken der mit CD38 immunisierten Lamas 538 und 539.....	48
Abb. 4.3: SDS-Page-Darstellung der Periplasmalysate nach Transformation von <i>E.coli</i> mit verschiedenen VHHs	49
Abb. 4.4: Analyse des Aufreinigungsprozesses der verschiedenen VHHs mittels SDS-Page	50
Abb. 4.5: Spezifität der VHH-Familien aus den Lamas 538 und 539.....	52
Abb. 4.6: Aminosäuresequenzen der bindenden VHH-Familien der Lamas 538 und 539	53
Abb. 4.7: Spezifität der VHH-Familien aus den Lamas 10 und 25.....	54
Abb. 4.8: Aminosäuresequenzen der untersuchten VHH-Familien der Lamas 10 und 25	55
Abb. 4.9: Übersicht über die selektierten, hCD38-spezifischen VHH-Familien aus den Lamas 10, 25, 538 und 539	56
Abb. 4.10: Umklonierung von VHH-kodierenden Inserts aus dem Vektor pHEN2 in den eukaryotischen Expressionsvektor pCSE2.5 mit c-Myc-6HIS- <i>tag</i> und als Fc- Fusionsprotein.....	58
Abb. 4.11: Expression der CD38-spezifischen VHHs als sezernierte Fusionsproteine in HEK293-6E Zellen.....	60
Abb. 4.12: Analyse des Aufreinigungsprozesses mittels SDS-Page.	62

Abb. 4.13: Titrationsanalyse der hCD38-Affinität der VHH-c-Myc-6xHIS-tag-Monomere der Lamas 10, 25, 538 und 539.....	64
Abb. 4.14: Enzyminhibitions-Assay.....	66
Abb. 4.15: Schematische Darstellung des Prinzips der Kreuzblockade.	67
Abb. 4.16: Relative Epitopkartierung durch Blockade-Analysen	71
Abb. 4.17: Schematische Darstellung der Umklonierung von Dara-scFv aus dem Vektor pMAT.2 in den eukaryotischen Expressionsvektor pCSE2.5 in zwei Formaten	72
Abb. 4.18: Vergleichende Analyse der Exprimierbarkeit von (A) Dara-scFv in <i>E.coli</i> , (B) Dara-scFv-Fc-Fusionsprotein in HEK293-6E-Zellen und (C) des Aufreinigungsprozesses mit Protein G.....	73
Abb. 4.19: (A) Epitop von Daratumumab	75
Abb. 4.20: Schematische Darstellung der Propidiumiodid-/Annexin-V-Färbung zur Differenzierung lebender, apoptotischer und nekrotischer Zellen	77
Abb. 4.21: Auswirkung verschiedener Dosen von humanem Serum im CDC-Assay	79
Abb. 4.22: Auswirkungen verschiedener VHH-Fc- und Dara-scFv-Fc-Konzentrationen im CDC-Assay mit murinen YAC-Zellen und 1 µl Serum.....	81
Abb. 4.23: Auswirkungen verschiedener VHH-Fc- und Dara-scFv-Fc-Konzentrationen im CDC-Assay mit humanen Zelllinien und 10 µl Serum	83
Abb. 5.1: Übersicht der Charakteristika der selektierten VHH-Familien	86
Abb. 5.2: Tabellarische Übersicht der Resultate der unterschiedlichen Immunisierungs- und Panningschemata.....	87
Abb. 5.3: Spezifität der Mitglieder der VHH-Familien L-8 und L-9.1 aus Positiv- und Negativselektion des Antigen-spezifischen Pannings	89
Abb. 5.4: Schematische Zuordnung der CD38-spezifischen VHHs zu ihren Epitopen	91
Abb. 5.5: Schematische Darstellung von humanem CD38 mit farblicher Kennzeichnung (grau) der beim Lama-CD38 abweichenden Aminosäuren	92
Abb. 5.6: Darstellung von CD38 mit gebundenen VHHs oder Antikörpern.....	94
Abb. 6.1: Vergleich der Aminosäuresequenzen von VHH-Familien aus der Primärbibliothek und nach dem Antigen-spezifischen Panning.....	99

1 Einleitung

In dieser Arbeit wird die Herstellung von Einzeldomänen-Antikörpern (VHHs) aus Schwereketten-Antikörpern immunisierter Lamas mit Spezifität für das humane CD38 sowie ihre Charakterisierung bezüglich Affinität, Epitop und ihres Potenzials zur Induktion einer zytotoxischen Immunreaktion beschrieben. Im Rahmen der Einleitung erfolgt zunächst eine Darstellung von Struktur und Funktion des Zielantigens, insbesondere bezüglich der Pathogenese hämatologischer Erkrankungen. Es folgt eine Einführung in die antikörperbasierte Immuntherapie, und im letzten Teil werden die Besonderheiten von Schwereketten-Antikörpern sowie die ersten Schritte ihrer Generierung aufgezeigt.

1.1 CD38

Humanes CD38 (hCD38) ist ein pH-abhängig multifunktionales Ektoenzym, welches einer hoch konservierten Enzymfamilie mit ADPR-Zyklase-Aktivität angehört (States et al., 1992, Malavasi et al., 2008, Quarona et al., 2011). CD38 unterscheidet sich von den anderen Mitgliedern der Familie durch seine transmembrane Lokalisation und evolutionär hinzugewonnene Funktion als Rezeptor (Deaglio et al., 2008, Deaglio et al., 2000). Es wird von Zellen des Immunsystems sowie Prostataepithelzellen, pankreatischen Inselzellen, Perikaryen, Neuronen des Großhirns und Purkinjezellen des Kleinhirns auf der Oberfläche exprimiert (Malavasi et al., 2008) und konnte auch innerhalb verschiedener Zellorganellen einschließlich des Nukleus nachgewiesen werden (Lee, 2006). Auf B-Zellen ist die Expression am stärksten ausgeprägt, unterliegt aber während ihrer Ontogenese einer starken Regulation. Besonders hoch ist das Vorkommen auf Knochenmarksvorläuferzellen und terminal differenzierten Plasmazellen, schwächer exprimiert wird es auf reifen B-Lymphozyten. Auch auf zirkulierenden Monozyten findet sich ein hohes Vorkommen, während die meisten T-Zellpopulationen sowie gewebsständige Monozyten, natürliche Killer-(NK)-Zellen, Makrophagen und Granulozyten eine niedrigere Expression aufweisen (Chillemi et al., 2013). Im Fokus des Forschungsinteresses steht hCD38 wegen seiner potenziellen Eignung als therapeutisches Zielantigen (Target) im Zusammenhang hämatologischer Erkrankungen (Deaglio et al., 2008, De Weers et al., 2011, Valsitti et al., 2014).

1.1.1 Struktur

Humanes CD38 besteht aus einer einfachen Kette aus 300 Aminosäuren (AS) mit einem korrespondierenden Molekulargewicht von 45 kDa. Als Transmembranprotein des Typs II besitzt es eine singlepass Transmembrandomäne und einen zytoplasmatisch gelegenen, N-terminalen Anteil von 21 AS. Die entsprechend große extrazelluläre Domäne erhält die Möglichkeit zu einer Vielfalt chemischer und biologischer Interaktionen mit anderen Molekülen durch vier Oligosaccharidketten mit negativ geladenen Sialinsäuren, die N-glykosidisch an CD38 gebunden sind (Liu et al., 2005).

Die räumliche Struktur der extrazellulären Domäne wurde durch Röntgenstrukturanalysen als L-förmig erkannt und ist in zwei Domänen unterteilt, die durch drei Peptidketten miteinander verbunden sind. Die oberflächennahe, N-terminale Domäne besteht vor allem aus α -Helices und zwei kurzen β -Faltblättern, die C-terminale Domäne aus viersträngigen, parallelen β -Blättern, umgeben von zwei langen und zwei kurzen α -Helices (Liu et al., 2005). Stabilisation erfährt die räumliche Struktur durch sechs Disulfidbrücken (Lee, 2006).

Das katalytische Zentrum befindet sich in der Mitte des Proteins in einer taschenförmigen Einbuchtung, deren Boden durch das TLEDTL-Motiv gebildet wird, eine hochkonservierte Sequenz unter den Mitgliedern der Familie. Eine hohe Dichte saurer AS bewirkt die Substratspezifität von CD38, indem pH-abhängig mehrere Substrate umgesetzt werden können. An Position 146 befindet sich eine Glutaminsäure (Glu) und an Position 155 eine Asparaginsäure (Asp), die durch ihre negative Ladung bei neutralem oder basischem pH bewirken, dass gleichfalls negativ geladene Substrate elektrostatisch abgestoßen werden und eine Bindung nur bei saurem pH gelingt, wenn die protonierte, neutrale Form der AS vorliegt (Lee, 2006). Bei neutralem pH fixieren sie ihr Substrat durch polare Interaktionen. Die Positionierung des Substrates geschieht durch zwei Tryptophane (Trp) an den Positionen 125 und 189, welche die Zyklisierung linearer Substrate ermöglichen. Die Erkennung von Anteilen der unterschiedlichen Substrate wird außerdem durch die Aminosäuren 126 (Ser), 127 (Arg), 221 (Thr) und 222 (Phe) vollzogen. Als unerlässlich für die katalytische Funktion von CD38 wurde die Glutaminsäure (Glu) an Position 226 erkannt, die zur Freisetzung der substratspezifischen, funktionellen Gruppe führt, auf die entweder die Hydrolyse oder Synthese folgt (Munshi et al., 2000, Liu et al., 2005, Liu et al., 2006, Zhang et al., 2011).

Die überwiegend positive Ladung der extrazellulären, N-terminalen Domäne lässt bezüglich der Interaktionen mit der Zellmembran eine Bevorzugung negativ geladener Phospholipide erwarten (Lee 2006).

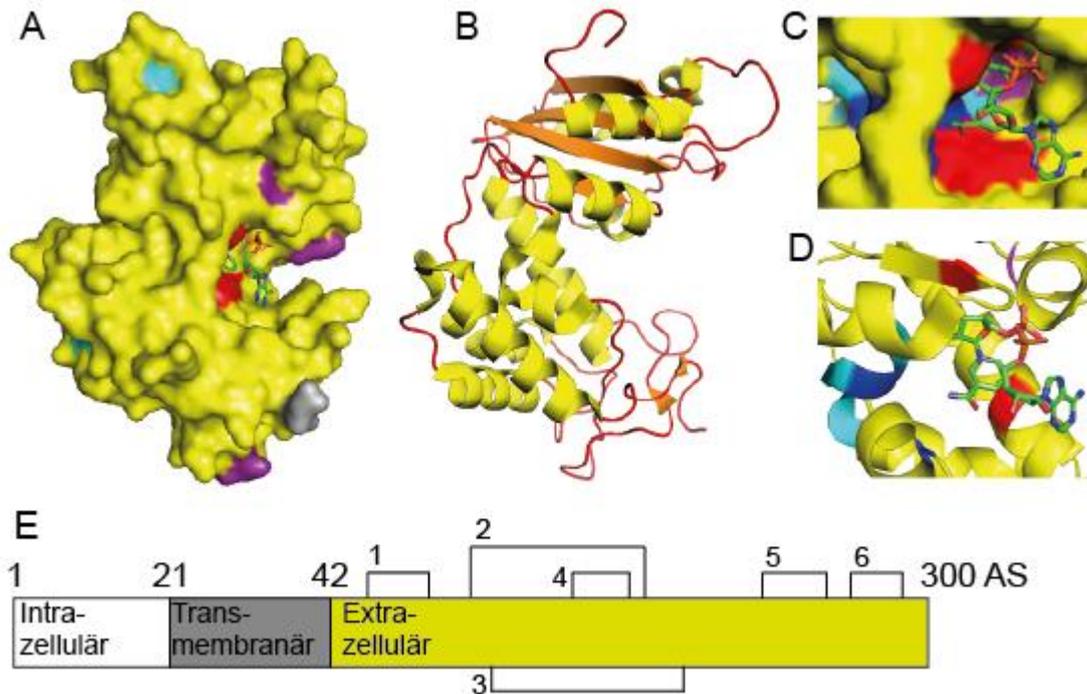


Abb. 1.1: Struktur von CD38. (A) Van der Waals Oberfläche. Im aktiven Zentrum ist das Substrat NAD gebunden, die Tryptophane an den Positionen 125 und 189 sind rot gekennzeichnet. Die Position der Disulfidbrücken ist in Türkis, Glykosylierungsstellen sind in Magenta, der N-terminale Bereich ist in Grau abgebildet. **(B) Darstellung als Cartoon.** α -Helices sind in Gelb, β -Faltblätter in Orange, Loops in Rot gezeigt. **(C) Darstellung des katalytischen Zentrums mit dem gebundenen Substrat NAD mit Van der Waals Oberfläche und (D) als Cartoon.** Das in der Enzymfamilie hochkonservierte TLEDTL-Motiv ist in Türkis dargestellt. Teil davon ist eine Glutaminsäure an Position 146 und eine Asparaginsäure an Position 155, die aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen pH-abhängig die Affinität von Substraten beeinflussen und in Blau dargestellt sind. Die an der Positionierung der Substrate mitwirkenden Tryptophane an den Positionen 125 und 189 sind rot und die katalytisch wirksame Glutaminsäure an Position 226 magenta gekennzeichnet. **(E) Schematische Darstellung der Domänen von CD38.** Mit 1 bis 6 sind die stabilisierenden Disulfidbrücken bezeichnet.

1.1.2 Funktion als Enzym und Rezeptor

Als Enzym synthetisiert CD38 unter sauren und neutralen, bzw. alkalischen pH-Bedingungen aus linearen sowie zyklischen Molekülen verschiedene Ca^{2+} -mobilisierende Botenstoffe (second messenger), die für Zellrekrutierung und Chemotaxis essenziell sind. Die pH-bedingte Substratspezifität von CD38 resultiert wesentlich aus elektrostatischen Wechselwirkungen, die durch Glutaminsäurereste im Bereich des katalytischen Zentrums verursacht werden (Lee, 2006).

Unter neutralen bzw. alkalischen pH-Bedingungen fungiert NAD^+ als Substrat. Durch die katalytische Funktion von CD38 wird die Nicotinamidgruppe abgespalten und Adenosin-Diphosphoribose (ADPR) gebildet, welches den größten Anteil der NAD-Metabolite ausmacht. Zusätzlich wird zyklisches ADPR (cADPR) synthetisiert, indem durch einen

intramolekularen Angriff des Adeninrings eine N-glykosidische Bindung des freien C5-Atoms der Ribose mit dem N1-Atom des Puringerüsts gebildet wird. Das Reaktionsprodukt cADPR kann in einer neuen enzymatischen Reaktion wieder zu ADPR hydrolysiert werden (Lee, 2006). Der größte Anteil an ADPR entsteht allerdings direkt, ohne den Umweg über cADPR (Bertheliet et al., 1998, Lee et al., 1999). CD38 ist das einzige bisher bekannte Enzym, welches cADPR spezifisch spalten kann (Lee, 2006).

Unter sauren Reaktionsbedingungen erfolgt aus NADP^+ und Nicotinsäure nach Abspaltung der Nicotinamidgruppe durch einen nukleophilen Angriff eine Basenaustauschreaktion, die zur Synthese von NAADP führt. Das Reaktionsprodukt NAADP kann durch CD38 weiter zu ADPRP hydrolysiert werden.

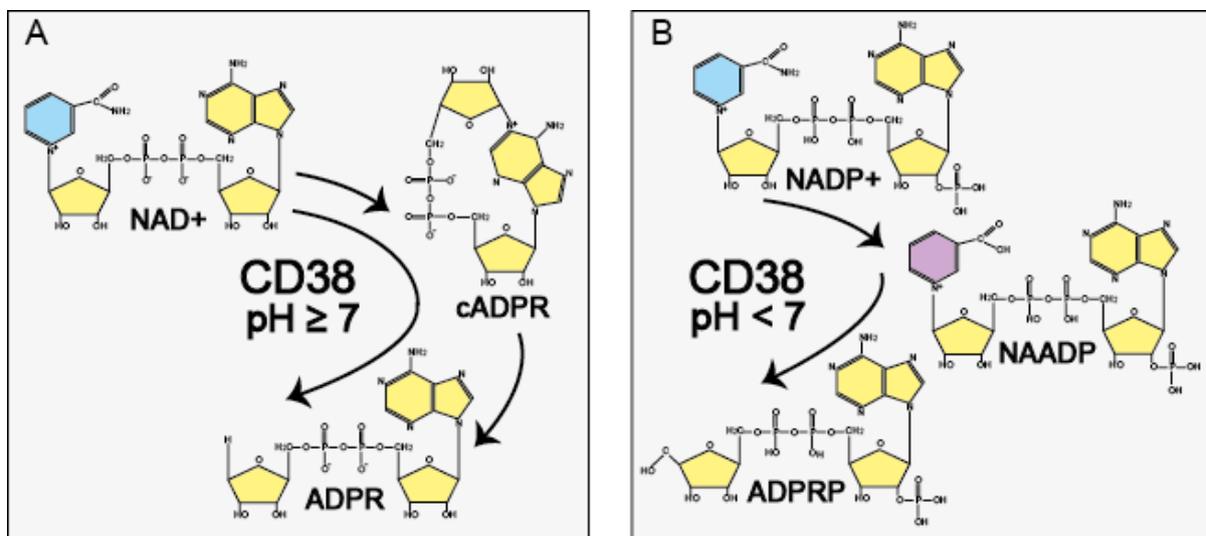


Abb. 1.2: Durch CD38 katalysierte Reaktionen. (A) Hydrolyse von NAD⁺ zu ADPR sowie Zyklase zu cADPR unter neutralen bis alkalischen pH-Bedingungen. Aus NAD⁺ werden durch Abspaltung der Nicotinamidgruppe ADPR oder cADPR synthetisiert, ein Teil des cADPR wird durch CD38 weiterverarbeitet, indem es zu ADPR hydrolysiert wird. **(B) Synthese von NAADP und Hydrolyse zu ADPRP unter sauren pH-Bedingungen.** Aus NADP⁺ und Nicotinsäure wird durch eine Basenaustauschreaktion NAADP synthetisiert und teilweise weiter zu ADPRP hydrolysiert. Funktionelle Gruppen sind farbig markiert, die Nicotinamidgruppe ist blau, die Nicotinsäure violett gekennzeichnet.

ADPR, cADPR und NAADP sind durch die Bindung unterschiedlicher Rezeptoren und Kanäle an der Modulation des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels beteiligt (Quarona et al., 2013, Malavasi et al., 2011). ADPR reguliert den Calciumeinstrom über TRPM2 (transient receptor potential cation channel member) in der Plasmamembran (Perraud et al., 2001), während NAADP Ca^{2+} aus sauren, intrazellulären Speichern in Organellen wie Lysosomen mobilisiert (Young et al., 2006) und cADPR, ein Ligand des Ryanodinrezeptors, einen Anstieg durch Ca^{2+} -Speicher des endoplasmatischen Retikulums auslöst (Guse, 1999, Lee, 2001). CD38 fungiert demnach als Schaltstelle für die extra- und intrazelluläre Calciummobilisation unter Bedingungen des neutralen, sauren oder alkalischen pHs. Diese Unabhängigkeit vom Milieu

der Umgebung kann insbesondere für den Signalweg der Endozytose in sauren Organellen eine Rolle spielen. Ein Vorteil der Akkumulation von Synthese und Hydrolyse der second messenger durch ein einziges Enzym ist, dass ihre effiziente Entfernung nach der Ausübung ihrer Signalfunktionen gewährleistet ist (Lee, 2006).

Durch seine NAD-Glykohydrolasefunktion begrenzt CD38 die Halbwertszeit des extrazellulären NAD und dessen Signalfunktionen (Deaglio et al., 2011). Es resultiert ein Entzug des Substrates für andere NAD-metabolisierende Enzyme, wie ADP-Ribosyltransferasen (ARTs) und somit eine Kontrolle des Niveaus der ADP-Ribosylierung von Zelloberflächenproteinen im Sinne einer NAD-Homöostase (Koch-Nolte et al., 2006).

In seiner Funktion als Transmembranrezeptor dient CD38 der Regulation des Zellebens. Durch die Bindung des insbesondere durch Endothelzellen exprimierten Liganden CD31 im Bereich der N-terminalen Domäne von CD38 wird eine Signalkaskade initiiert, die durch Phosphorylierung intrazellulärer Targets das zytoplasmatische Ca^{2+} -Level anhebt. CD38 arbeitet dabei synergistisch mit zellspezifischen, supramolekularen Signalkomplexen (Lande et al., 2002).

In T-Lymphozyten folgt der Ligation von CD38 eine Komodulation des T-Zell-Rezeptor-(TCR/CD3)-Komplexes und über die intrazelluläre Tyrosinphosphorylierung von CD3, ZAP70, LAT und Shc ein Anstieg verschiedener Zytokine (IL-6, GM-CSF, IFN- γ und IL-10). Bei naiven T-Lymphozyten wird die Aktivierung und Migration durch das Endothel vermittelt, in Thymozyten wird durch die Bindung des Liganden CD31 die Apoptose ausgelöst. In der Lamina Propria ruhende und TCR/CD3-Signal-refraktäre T-Lymphozyten sind sensibel für CD38-vermittelte Signale, welche die Sekretion von Zytokinen induzieren, ohne dass ein Ca^{2+} -Anstieg resultiert (Deaglio et al., 2008).

In B-Lymphozyten ist CD38 mit dem B-Zell-Rezeptorkomplex, bestehend aus B-Zell-Rezeptor (BCR) und den Molekülen CD19, CD21 und CD81, assoziiert (Lund et al., 1996, Schuber et al., 2004). Die funktionelle Auswirkung von ligandengebundenem CD38 ist abhängig vom Grad der Reife der Zelle. Durch In-vitro-Blockade von CD38 auf CD19-positiven B-Vorläuferzellen wurde eine Inhibition der Lymphopoese beobachtet, Resultat ausbleibender DNA-Synthese sowie verstärkter Apoptose. CD19 erwies sich dabei als wesentlicher Bestandteil des von CD38 ausgelösten Signalwegs (Deaglio et al., 2008). In reifen, zirkulierenden B-Zellen zeigt sich Aktivierung, Apoptoseinhibition, Proliferation und Zytokinsekretion, ausgelöst durch die CD38 abhängige Dimerisierung und Tyrosinphosphorylierung der Kinasen PLC- γ , c-cbl und PI3K, wie sie auch in T-Zell-Modellen und in myeloiden Zellen festgestellt werden konnte (Malavasi et al., 2011). Antikörperproduktion wurde in keinem Fall beobachtet.

Myeloide Zellen reagierten außerdem mit einem Anstieg der Anzahl der koloniebildenden Einheiten (colony forming units, CFU) sowie der Zellteilung im Knochenmark. In zirkulierenden Monozyten resultiert die Induktion der Zytokine IL-1 β , IL-6 und IL-10 (Lande et al., 2002), in dendritischen Zellen wird die Chemotaxis und transendotheliale Migration im Zusammenspiel mit dem Chemokin CCL21 gewährleistet. NK-Zellen reagieren auf die Ligation von CD38 mit Ca²⁺-Anstieg, Freisetzung von Zytokinen und Induktion zytolytischer Effektorfunktionen (Deaglio et al., 2008).

Als Regulationsmechanismen der CD38-abhängigen, enzymatischen und rezeptoriellen Signale werden einerseits die Anordnung der CD38-Moleküle in Konformationen als Monomer, Dimer oder Tetramer (Hara-Yokoyama et al., 2012) oder ein Flip-Flop-Mechanismus, der eine Umwandlung in ein Typ III Transmembranprotein, welches seine katalytische Seite intrazellulär enthält, diskutiert (Zhao et al., 2012). Funktionell charakterisierend wirkt außerdem die Lokalisation des Proteins in lipid rafts, dynamisch geordneten, Sphingolipid- und Membranproteinreichen Nanostrukturen innerhalb der Zellmembran, die zellspezifisch Wechselwirkungen mit supramolekularen Signalkomplexen und anderen Proteinen der Membran initiieren oder limitieren (Quarona et al., 2013, Deaglio et al., 2008, Deaglio et al., 2007, Pavon et al., 2006). Inwiefern die Funktionen als Rezeptor und Enzym einer gegenseitigen Beeinflussung unterliegen, ist bisher nicht eindeutig beantwortet. Die Postulation einer weitgehenden Unabhängigkeit der Funktionen basiert auf der Beobachtung, dass einer Ligation von CD38 kein veränderter enzymatischer Output folgt und das Hinzufügen enzymatischer Substrate keine Veränderung rezeptoriell bedingter Zellantworten erbringt (Deaglio et al., 2008).

Die Röntgenstrukturanalyse von CD38 bietet hingegen Hinweise auf Wechselwirkungen zwischen den Funktionen von CD38, indem die Bindung an CD31 den Zugang des Substrates zum katalytischen Zentrum räumlich-strukturell limitiert (Liu et al., 2005). Aufgrund eines experimentell gezeigten Verlusts der CD31-Bindungsfähigkeit nach Manipulation der enzymatischen Funktion von CD38 wird die CD31-Ligation ebenfalls als Prämisse für enzymatische Aktivität im Sinne einer Stabilisierung der enzymatisch-aktiven Formierung von CD38 als Dimer oder Multimer diskutiert (Vaisitti et al., 2014).

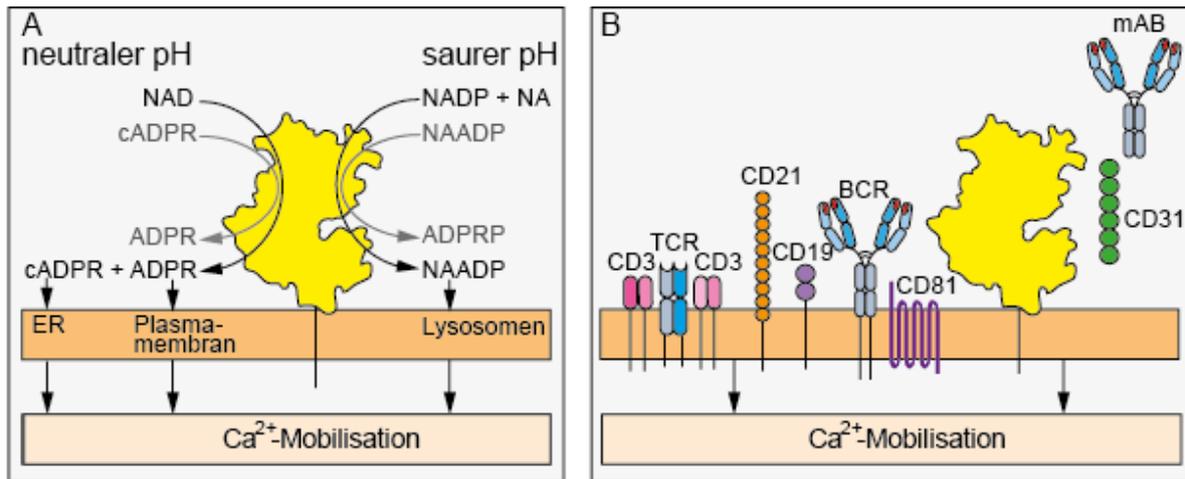


Abb. 1.3: CD38 als Enzym und Rezeptor. (A) Als Enzym katalysiert CD38 pH-abhängig die Synthese unterschiedlicher, Ca²⁺-mobilisierender second messenger. (B) Als Rezeptor löst CD38 vermittelt durch die Bindung von CD31 oder von monoklonalen Antikörpern eine intrazelluläre Signalkaskade aus, die zu einer Anhebung des zytosmatischen Ca²⁺-Levels führt. CD38 ist dabei assoziiert mit den entsprechend dem Zelltyp variierenden, supramolekularen Signalkomplexen wie dem T-Zell-Rezeptorkomplex (TCR/CD3) oder dem B-Zell-Rezeptor (BCR) und induziert je nach Zelltyp unterschiedliche Zellantworten.

1.1.3 CD38 im Rahmen hämatologischer Erkrankungen

Das physiologische Vorkommen von CD38 zeigt es als Komponente eines Systems, das abgestimmt auf das jeweilige Umfeld Aktivierung oder Suppression von Immunantworten generiert. CD38-Knockoutmäuse zeigen abgeschwächte humorale Immunantworten, die auf die beeinträchtigte Migration von dendritischen Zellen in sekundäre lymphatische Organe (Höpken et al., 2004) und eine verminderte T-Zellaktivierung, die auch die T-Zellhilfe für B-Zellen einschränkt, zurückgeführt wird (Lund et al., 1995, Cockayne et al., 1998). Weiterhin weisen diese Mäuse eine funktionsbehindernde Deformierung von Osteoklasten sowie Beeinträchtigung der Insulinsekretion auf (Lee, 2006), sodass eine Verbindung von CD38 mit der Entstehung von Typ1- und 2-Diabetes diskutiert wird (Mallone et al., 2001, Mallone et al., 2002, Deaglio et al., 2008). Weitere mit CD38 assoziierte Krankheiten sind HIV-Infektionen (Deaglio et al., 2008), systemischer Lupus Erythematodes (Pavon et al., 2006) und Störungsbilder des autistischen Spektrums (Higashida et al., 2012, Sauer et al., 2012). Eine Überexpression von CD38 wird im Rahmen maligner Prozesse beobachtet. Der Grund wird darin gesehen, dass eine Modulation seiner enzymatischen und rezeptoriellen Funktion für Tumorzellen einen Überlebensvorteil im Sinne einer Umgehung des Immunsystems bewirkt (Quarona et al., 2013). CD38 wird in variierender Dichte im Zuge von Erkrankungen des B-Zellkreises wie der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) und dem multiplen Myelom (MM) exprimiert. Neben den klinisch gewonnenen Daten zeigen auch Analysen eines breiten Panels von Zelllinien, die Myelom-, Lymphom- und Plasmazellleukämiepatienten

entstammend in Kultur gehalten werden, hohe Expressionen von CD38, die zur Verwendung dieser Zelllinien für In-vitro- und In-vivo-Experimente führten (Chillemi et al., 2013).

1.1.3.1 Chronische lymphatische Leukämie

Im klinischen Kontext dient CD38 der Klassifikation der CLL als prognostisch ungünstiger Marker. Hohe CD38-Expressionen gehen mit schnellerer Progression einher und sind assoziiert mit einem fortgeschrittenen Stadium, höherem Vorkommen von Lymphadenopathie, kürzerer Lymphozytenverdopplungsrate und schlechterem Therapieansprechen (Deaglio et al., 2006, Malavasi et al., 2011, Vaisitti et al., 2014).

Bei der CLL kommt es zur klonalen Vermehrung von reifen, kleinzelligen aber funktionslosen B-Lymphozyten, die in dynamischer Balance im Blut und in lymphatischen Organen vorkommen, in deren Proliferationszentren sie abhängig von der individuellen Mikroumgebung, wie dem Grad der CD38-Expression, Proliferation oder Apoptose erfahren. Die Rate neugeborener Zellen liegt bei gesteigerter CD38-Expression signifikant höher als bei CD38-negativen Zellen desselben Klons (Calissano et al., 2009). Dies resultiert aus der größeren Sensibilität CD38-positiver Zellen für die Auswirkungen bestimmter Chemokine und ihrer Rezeptoren, insbesondere CXCL12 und CXCR4 (Zucchetto et al., 2009, Zucchetto et al., 2012). CXCL12 wird neben vaskulären Endothelialzellen auch von Stromazellen des Knochenmarks und nurse like cells (NLCs) exprimiert (Burger, 2011). Eine hohe Expression von CD38 steigert die CXCL12-induzierte Chemotaxis (Deaglio et al., 2005, Malavasi et al., 2011). Hierdurch werden migratorische Prozesse positiv beeinflusst und die Rezirkulation der Zellen aus der Peripherie zu Proliferationszentren in den lymphatischen Organen gefördert (Vaisitti et al., 2010). Durch Xenograft-Experimente konnte in CD38-positiven, leukämischen Zellen ein ADPR-induzierter Ca^{2+} -Anstieg detektiert werden. Einen weiteren Hinweis auf die Bedeutung der enzymatischen Funktion von CD38 in der Pathogenese der CLL bietet die Blockade der enzymatischen Funktion von CD38 mit Kuromarin, die im Xenograft-Modell zur Senkung von Proliferation und Rezirkulation leukämischer Zellen führte (Vaisitti et al., 2014).

Innerhalb der Proliferationszentren exprimieren folliculäre dentritische Zellen und NLCs den CD38-Liganden CD31, dessen Ligation als Prämisse für die enzymatische Funktion von CD38 diskutiert wird (Vaisitti et al., 2014). In den B-Lymphozyten wird ein intrazellulärer Signalweg aktiviert, der ZAP70 einschließt, welches ebenfalls als negativer Marker für CLL fungiert und zudem bei Abwesenheit limitierend auf die durch CD38 ausgelösten Effekte wirkt (Deaglio et al., 2008, Malavasi et al., 2011). Die CD38/ZAP70-Interaktion wirkt synergistisch mit den Signalen des BCR, zusätzlich wird eine Verbindung mit einem durch CXCR3, CXCR4 und CCR7 kontrollierten Signalweg diskutiert (Deaglio et al., 2008, Deaglio

et al., 2007). Die Signaltransduktion resultiert in Proliferation und Überleben der Zellen und führt dadurch mit größerer Wahrscheinlichkeit zu neuen genetischen Läsionen, welche die Krankheitsprogression vorantreiben (Deaglio et al., 2005, Malavasi et al., 2011). Der Prozentsatz CD38- und ZAP70-positiver Zellen in der Peripherie spiegelt den Grad der Aktivierung dieses weiterhin wirksamen CD31/CD38/ZAP-70-Signalweges direkt wider (Deaglio et al., 2003, Deaglio et al., 2007a).

Die CLL ist somit eine chronische Krankheit, bei der die gewebsspezifische Mikroumgebung des Trägers das heterogene klinische Erscheinungsbild der CLL bedingt, indem sie zur Förderung des Wachstums der CLL-Zellen und zur sequenziellen Anhäufung genetischer Alterationen beiträgt (Malavasi et al., 2011, Quarona et al., 2013). In dieser Pathogenese ist CD38 ein zentraler Faktor und erlaubt durch die Dynamik seiner Expression eine Einschätzung der aktuellen und potenziellen klonalen Evolution und ist damit von unmittelbarer klinischer Bedeutung für weitere Therapieentscheidungen (Malavasi et al., 2011).

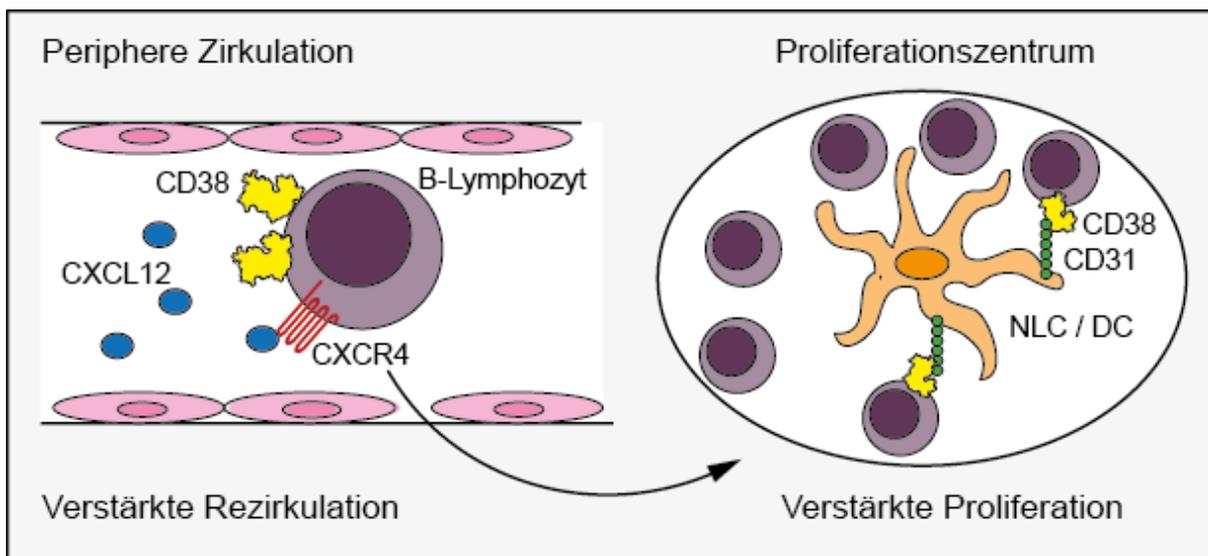


Abb. 1.4: CD38 in der Pathogenese der CLL. Dargestellt ist ein Modell der Mechanismen, die zur aggressiveren Proliferation CD38-positiver, leukämischer B-Lymphozyten führen. CD38 erhöht CXCL12- und CXCR4-vermittelt die Neigung von B-Lymphozyten zur Rezirkulation aus der peripheren Blutzirkulation in die Proliferationszentren (Homing). Vorhandensein des CD38-Liganden CD31 auf akzessorischen Zellen führt zu vermehrter Proliferation und potenziellen neuen genetischen Läsionen der CD38-positiven B-Lymphozyten. Abbildung modifiziert nach Malavasi et al., 2011.

1.1.3.2 Multiple Myelome

Das MM ist eine weitere Erkrankung des B-Zellkreises, die mit einer massiven Erhöhung der CD38-Expression auf den neoplastischen Zellen einhergeht. Ein MM ist durch eine maligne Vermehrung von Plasmazellen im Knochenmark und deren pathologischer Produktion von funktionslosen Antikörpern oder Antikörperfragmenten, sog. Leichtketten, gekennzeichnet.

Diese Antikörper sind genetisch identisch, also monoklonal, denn die Plasmazellen, die sie produzieren, stammen von einer gemeinsamen Vorläuferzelle ab. Das MM geht mit hohen Konzentrationen der neoplastischen Plasmazellen im Knochenmark einher und in Serum und Urin finden sich hohe Konzentrationen der Antikörper oder Leichtketten. Die Proliferation der malignen Plasmazellen behindert die normale Produktion der Blutzellen, während die funktionslosen Antikörper die Balance der humoralen Immunität stören (Quarona et al., 2013). Die malignen Zellen scheiden außerdem Wachstumsfaktoren aus, die zur Aktivierung von Osteoklasten führen, was den Knochenabbau verstärkt und zu lytischen Knochenläsionen führt. Die mit dem Urin ausgeschiedenen Leichtketten können auf unterschiedliche Weise die Nieren schädigen (Quarona et al., 2014).

Der Differenzierungsprozess zu Plasma- und Myelomzellen geht mit einer Herunterregulation von Oberflächenmolekülen wie dem BCR oder MHCII sowie einer verstärkten CD38-Expression einher (Chen-Kiang, 2005). Nahezu 100 % der Myelomzellen exprimieren CD38 in hoher Dichte (Sherbenou et al., 2014), zudem findet sich in einer signifikanten Anzahl der Fälle von Myelomen die Expression von CD31, dem Liganden von CD38 (Quarona et al., 2014), der kausale Zusammenhang zwischen der hohen Expression und der Pathogenese des MM konnte bisher jedoch nicht eruiert werden. Hinweise geben Experimente in Xenograft-Modellen, die zeigen, dass CD38 durch Induktion der calciumabhängigen Ausschüttung ein Schlüsselregulator des Levels von Oxytocin (OT) in biologischen Körperflüssigkeiten ist. OT ist ein Hormon, welches unter anderem von humanen Osteoblasten freigesetzt wird, und ein Rezeptor für OT (OTR) findet sich auf Myelomzellen und davon abgeleiteten Zelllinien. CD38 wird auch von Osteoblasten und Osteoklasten exprimiert, wo es Teil eines Signalweges ist, der zur IL-6-Freigabe und Inhibition der Knochenresorption führt (Quarona et al., 2013).

Eine Verbindung zwischen CD38-Expression und der Hemmung von Immunabwehrreaktionen besteht durch seine Funktion als NAD-Glykohydrolase. Durch CD38 entsteht ADPR, welches als Substrat des Ektoenzym CD203a zu AMP und durch CD73 weiter zu Adenosin generiert wird. Dieser Signalweg ist insbesondere von Konsequenz für das Knochengewebe, denn während CD38 von Myelomzellen exprimiert wird, ist CD203a auf Stromazellen und Osteoblasten zu finden. CD73 wird auf der Oberfläche von Tumoren oder auf umgebenden T- und NK-Zellen exprimiert, und in geschlossenen Systemen wie dem Tumor-Mikroenvironment kann auf diesem Signalweg durch den Immunsuppressor Adenosin eine lokale Anergie und Erhöhung der Tumordiffusion folgen (Chillemi et al., 2013).

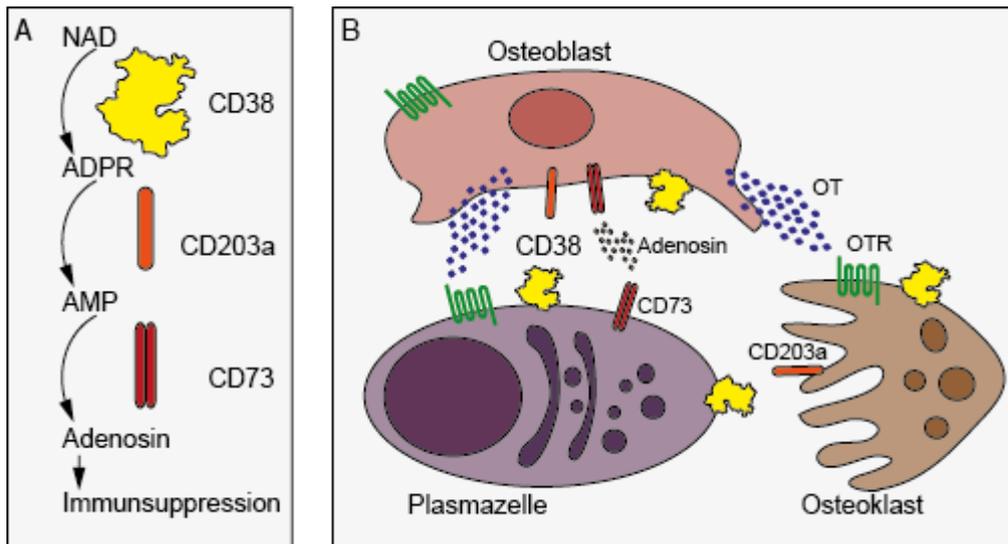


Abb. 1.5: CD38 in der Pathogenese des MM. (A) Modell der Produktion des Immunsuppressors Adenosin im System der Tumor-Mikroumgebung. CD38 katalysiert die Synthese von ADPR aus NAD, welches in zwei weiteren Schritten zu Adenosin generiert wird. CD38 wird von Myelomzellen, CD203a von Stromazellen und Osteoblasten und CD73 auf T- oder NK-Zellen exprimiert. **(B) Modell der CD38-induzierten, calciumabhängigen Ausschüttung von Oxytocin in der Mikroumgebung des Knochenmarks sowie des Zusammenspiels der Proteine CD38, CD73 und CD203a bei der Generierung von Adenosin.** Abbildung modifiziert nach Quarona et al., 2013. OT = Oxytocin, OTR = Oxytocinrezeptor.

1.2 Antikörperbasierte Krebsimmuntherapie

Die antikörperbasierte Immuntherapie ist entscheidend für die erfolgreiche Behandlung vieler Arten von Krebserkrankungen geworden, wie die gestiegene Anzahl der durch die europäische (EMA) und die amerikanische (FDA) Zulassungsbehörde zugelassenen therapeutischen Antikörper verdeutlicht (Wu, Senter, 2005). Im Folgenden werden zunächst monoklonale Antikörper (mAk) als Werkzeuge der Immuntherapie sowie deren Anwendungen und durch sie induzierte Immunmechanismen beschrieben und zuletzt ein Überblick über die Verwendung von CD38 als Zielantigen immunologischer Therapieansätze gegeben.

Monoklonale Antikörper, wie sie bisher in der Krebsimmuntherapie Verwendung finden, sind Glykoproteine, deren Funktion im Immunsystem von Wirbeltieren darin besteht, als Reaktion auf Fremdstoffe und Pathogene in großen Mengen von differenzierten B-Lymphozyten sezerniert zu werden und diese Antigene zu kennzeichnen. Die Aktivierung der B-Zellen durch den Kontakt des BCR mit einem passenden Antigen resultiert in einer klonalen Expansion der Zelle. Durch diese identischen Nachkommen werden klonotypische Antikörper mit derselben Antigen-spezifität des ursprünglich aktivierten BCR sezerniert. Konventionelle Y-förmige Antikörper binden Antigene mit ihren Armen, die als fragment antigen binding (Fab)-Fragment bezeichnet werden, während der Schaft des Y mit

körpereigenen Effektorzellen interagiert und diese zur Zerstörung der gebundenen Antigene mobilisiert. Dies ist das fragment crystallizable (Fc)-Fragment (Murphy et al., 2008).

In der antikörperbasierten Krebstherapie werden biotechnologisch mAk hergestellt, die an Zielstrukturen im menschlichen Körper binden, die spezifisch auf Tumorzellen exprimiert werden (An, 2010, Karyampudi, Knutson, 2010, Kazemi et al., 2015). In der Bildgebung werden sie als Transporter für signalgebende Moleküle genutzt, die körperextern mithilfe bildgebender Verfahren detektiert und lokalisiert werden können (Wu, Senter, 2005, Wu, Olafson, 2008, Wu, 2009). Bei der Kopplung von Radionukliden an mAk werden diese mittels Szintigrafie, Positronen-Emissions-Tomografie (PET) oder single photon emission computed tomography (SPECT) im Körper eines Patienten verfolgt (Reddy, Robinson, 2010, Wu, 2009). Weiterhin besteht die Möglichkeit einer Kopplung an Eisenoxid-Konjugate für die Visualisierung durch den Magnetresonanztomografen (MRT) oder an Fluorochrome, die durch ihre Emission von Licht spezifischer Wellenlänge detektiert werden können (Wu, Olafson, 2008, Gauberti et al., 2014). Diese bildgebenden Verfahren ermöglichen eine funktionelle Darstellung von Krebstherapien, die primär auf einer Regulation des Metabolismus und der Mikrozirkulation der Tumoren beruht (Waldmann, 2003, Wu, Senter, 2005, Frangioni et al., 2008). Mithilfe der Fluoreszenzmarkierung konnten sogar intraoperativ metastatische Strukturen gezeigt werden (Terwisscha van Scheltinga et al., 2011). Antikörper werden auch als Transportmittel für Chemotherapeutika verwendet, um deren Pharmakokinetik zu verbessern, indem die Antikörper für eine spezifische Akkumulation der Therapeutika am anvisierten Wirkungsort und geringere systemische Nebenwirkungen sorgen (Waldmann, 2003). Große Wirkung zeigen Antikörper insbesondere durch ihre Funktion als Initiatoren von Prozessen der körpereigenen Immunabwehr.

1.2.1 Direkte Antikörperwirkung

Die Antikörperbindung selbst kann beruhend auf einer Kreuzvernetzung des Tumorantigens durch die Fab-Fragmente der Antikörper eine intrazelluläre Signalkaskade in der Krebszelle auslösen, die eine antiproliferative Wirkung oder eine unmittelbare Apoptose der Zelle zur Folge hat. Durch die Bindung des Tumorantigens CD20 löst der Antikörper Rituximab calciumabhängig die Apoptose aus (Shan et al., 1998), durch die Bindung des Tumorantigens CD22 kann sich im Rahmen der Haarzell-Leukämie eine antiproliferative Wirkung entfalten (Meng et al., 2004). Proliferationsinhibierend wirkt ebenfalls der Antikörper Trastuzumab, der den Her2/neu-Rezeptor und dessen Signalkette zum epidermalen Wachstumsfaktor blockiert, sodass sich das Tumorstadium verlangsamt (Harries, Smith 2002, Maass et al., 2015). Bezüglich des Antigens CD38 kann der Antikörper SAR650984 bei Bindung apoptotisch wirksam werden (Deckert et al., 2014).

1.2.2 Komplementabhängige Zytolyse (Complement Dependent Cytolysis, CDC)

Antikörper induzieren durch Aktivierung des Komplementsystems Reaktionen des unspezifischen, humoralen Immunsystems. Das Komplementsystem besteht aus mehr als 30 löslichen Plasma- und Membranproteinen, die in einer Kettenreaktion zusammenwirken, in deren Verlauf durch verschiedene Spaltungsreaktionen aus inaktiven Plasmakomponenten proteolytische Enzyme produziert werden, die kovalent an die Oberfläche eines Erregers binden und ihn zerstören können. Die Komplementkaskade kann nicht nur Antikörper vermittelt über den klassischen Weg aktiviert werden, sondern auch durch Mannose bindendes Lektin oder spontan, Antikörper unabhängig über den alternativen Weg initiiert werden (Murphy et al., 2008).

IgG- oder IgM-Antikörper besitzen Rezeptoren für das Startprotein C1, welches als Komplex der drei Untereinheiten C1q, C1r und C1s besteht. Das C1q-Molekül besitzt sechs globuläre Köpfe, die über filamentöse Domänen mit einem gemeinsamen Stamm verbunden sind und an Fc-Domänen binden können. C1q bindet nur mit geringer Affinität an freie IgG-Antikörper in Lösung. Die zur Aktivierung erforderliche Bindungsenergie wird durch Bindung an zwei oder mehr Antikörper, die sich durch Antigenbindung in einem Abstand von 30 bis 40 nm befinden, erreicht. Eine Verstärkung wird bei einer Formierung der Fc-Anteile der gebundenen IgG-Antikörper zu Hexameren propagiert (Diebolder et al., 2014). Die resultierende Aktivierung besteht in einer Konformationsänderung des C1-Moleküls, durch die eine autokatalytisch wirksame, enzymatische Aktivität von C1r initiiert wird, durch die das assoziierte C1s gespalten und daraus eine aktive Serinprotease erzeugt wird. Diese spaltet C2 und C4, die nächsten beiden Komponenten der Komplementkaskade, in zwei Untereinheiten. C2a und C4b bilden zusammen die C3-Konvertase, die C3-Moleküle spaltet. Indem sich das Spaltprodukt C3b an den C2aC4b-Komplex anlagert, bildet sich die C5-Konvertase, die C5-Moleküle dadurch fängt, dass diese an eine Akzeptorstelle an C3b binden und der Serinprotease C2b zugänglich gemacht werden. Nach der Freisetzung von C5b leitet dieses eine Zusammenlagerung der Komplementkomponenten C6, C7 und C8 ein. Dieser Komplex kann nach Konformationsänderungen durch die Exposition hydrophober Domänen an der Zellmembran binden und bildet einen Rezeptor für die Anlagerung des C9-Moleküls, welches in zirkulärer Weise homopolymerisiert und zu einer porenbildenden Struktur führt, die als membranangreifender Komplex bezeichnet wird. Mit einer hydrophoben äußeren Oberfläche, durch die eine Assoziation mit der Lipiddoppelschicht der antigenbehafteten Zelle erfolgen kann, und einem hydrophilen inneren Kanal verursacht der membranangreifende Komplex den Verlust der zellulären Homöostase, indem gelöste Moleküle, Ionen und Wasser frei durch die Lipiddoppelschicht gelangen. Resultat ist die

Zerstörung des Protonengradienten über der Membran, das Eindringen von Enzymen wie Lysozym in die Zellen, kolloidosmotische Schwellung und schließlich die Zerstörung des Pathogens bzw. der antigenbedeckten Zelle (Murphy et al., 2008, Sonnen et al., 2014). Für die gezielte Lyse kernhaltiger Zellen sind 12-16 membranangreifende Komplexe nötig, da durch endozytotische Prozesse ein singulärer Komplex inhibiert und der Schaden repariert werden kann (Zhou et al., 2008). Zur Eindämmung der potenziell schädigenden, entzündungsunterhaltenden Wirkung der verbliebenen Spaltprodukte C3a, C4a oder C5a auf autologe Zellen existieren mehr als zehn Plasma- und Membranproteine, die an verschiedenen Punkten der Komplementkaskade inhibitorisch wirksam werden können (Zhou et al., 2008).

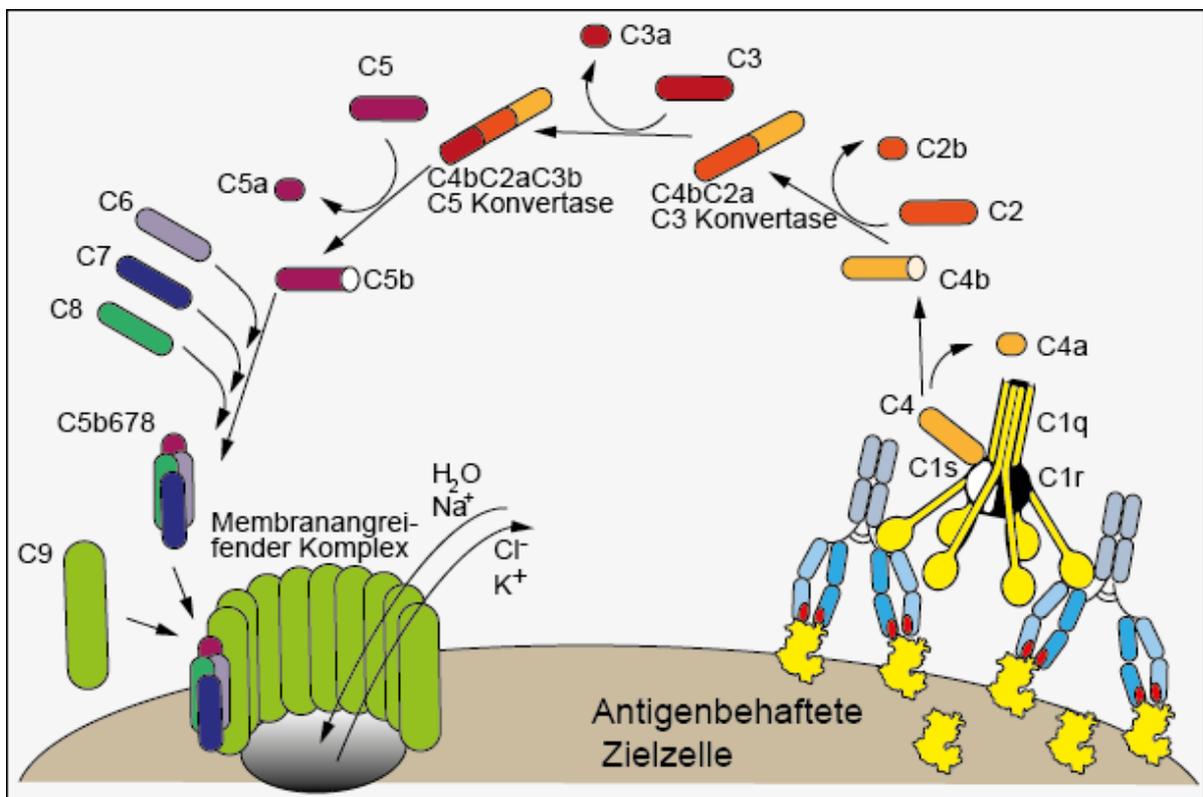


Abb. 1.6: Schematische Darstellung des Mechanismus der komplementabhängigen Zytolyse (Complement Dependent Cytolysis, CDC). Die CDC ist ein humoraler, immunologischer Abwehrmechanismus. Die Bindung eines IgM- oder mehrerer IgG-Antikörper an zelloberflächenpräsentierte Antigene induziert eine Kettenreaktion, die als Komplementkaskade bezeichnet wird und Spaltungsreaktionen und Konformationsänderungen von neun Glykoproteinen C1-9 beinhaltet, durch die aus inaktiven Plasmakomponenten proteolytische Enzyme entstehen, die kovalent an die Oberfläche der antigenbedeckten Zielzelle binden und sie zerstören. Nach seiner Aktivierung wirkt C1 autokatalytisch, und die entstehende Serinprotease spaltet die Komponenten C2 und 4 proteolytisch. Aus C2a und C4b entsteht zunächst die C3-Konvertase und nach Anlagerung des Spaltproduktes C3b ein Komplex, der C5b freisetzt. Dieses leitet die Zusammenlagerung der Komplementkomponenten C6, C7 und C8 ein, die sich der Membran der Zielzelle anlagern und einen Rezeptor für sich ringförmig polymerisierendes C9 bilden. Diese als membranangreifender Komplex bezeichnete, porenbildende Struktur bewirkt den Verlust der zellulären Homöostase und schließlich die Lyse der Zelle. Die Abbildung wurde modifiziert nach Murphy et al., 2008.

1.2.3 Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity, ADCC)

Neben der Komplementaktivierung sind Antikörper vor allem in die zelluläre Immunantwort eingebunden. Die Zerstörung von antikörperbedeckten Zielzellen durch körpereigene Effektorzellen wird als ADCC bezeichnet und kann im therapeutischen Kontext zur gezielten Zerstörung pathogener Zellen genutzt werden. Akzessorische Effektorzellen, die einen Fc-Rezeptor besitzen, wie Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und NK-Zellen, binden über diesen an das Fc-Fragment von Antikörpern. Die Unterscheidung der an ein Pathogen gebundenen Antikörper von der Mehrheit der freien Antikörpermoleküle wird durch die Aggregation der Antikörper gewährleistet, zu der es kommt, wenn sie an multimere Antigene oder antigene Partikel binden. Insbesondere der Rezeptor $Fc\gamma RIIIa$ (CD16) initiiert ADCC und wird in hohem Maß von NK-Zellen exprimiert. Der Kontakt dieser Rezeptoren mit gebundenen Antikörpern führt zur calciumabhängigen Freisetzung zytoplasmatischer Granula, die Perforin und Granzyme enthalten. Granzym gelangt perforinvermittelt in Form multimerer Komplexe in das Zytosol der Zelle und löst durch die Aktivierung von Caspasen die Apoptose aus. Die apoptotischen Zellen werden von Makrophagen, dendritischen oder neutrophilen Zellen phagozytiert (Murphy et al., 2008, Seidel et al., 2013, Vidarsson et al., 2014).

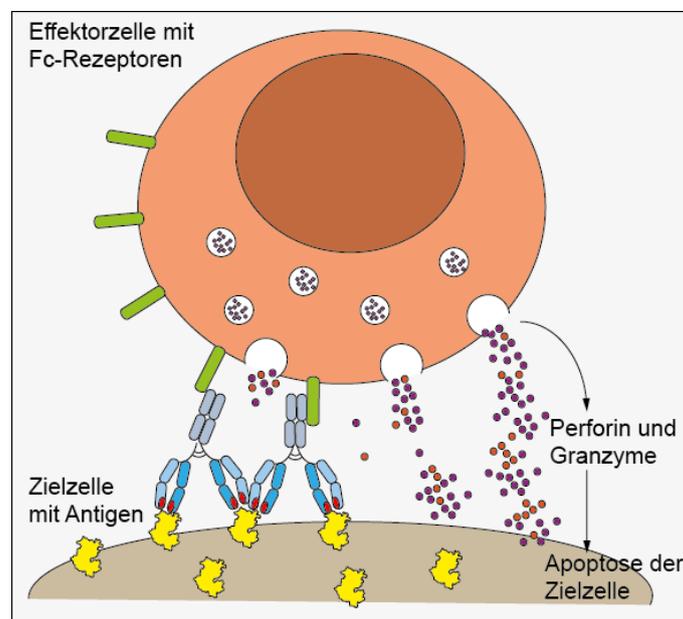


Abb. 1.7: Schematische Darstellung des Mechanismus der antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity, ADCC). Die ADCC ist ein zellulärer und humoraler, immunologischer Abwehrmechanismus. Indem Antikörper mit ihren Fab-Fragmenten spezifische Antigene auf der Membran einer Zelle binden, präsentieren sie ihre Fc-Anteile, die entsprechende Rezeptoren auf körpereigenen Effektorzellen vernetzen können und über die Freisetzung zytoplasmatischer Granula eine Schädigung der Zellmembran der Zielzelle und deren Apoptose bewirken. Die Abbildung wurde modifiziert nach Murphy et al., 2008.

1.2.4 Komplementabhängige zellvermittelte Zytolyse (Complement Dependent Cellular Cytolysis, CDCC)

CDCC beschreibt einen Synergismus zwischen zellulärer und humoraler Immunantwort, indem zellgebundene Spaltprodukte der Komplementkaskade, wie C3b, iC3b, C1q und C4b, als Opsonine fungieren, Effektorzellen aktivieren und die Phagozytose induzieren. Diese Prozesse werden verstärkt durch chemotaktisch und zellaktivierend wirksame Anaphylatoxine wie C5a. Der Mechanismus der CDCC wird teilweise in die ADCC inkludiert (Harjunpää et al., 2000, Zhou et al., 2008).

1.2.5 CD38 als Target

Immuntherapeutische Antikörper sollen durch direkte Beeinflussung intrazellulärer Signalwege oder Induktion von Immunantworten wie ADCC und CDC zytostatische oder zytotoxische Wirkung zeigen. Zur Realisation dieser Mechanismen werden Targets benötigt, die möglichst spezifisch und in hoher Dichte von malignen Zielzellen exprimiert werden (Chillemi et al., 2013) und eine entscheidende Rolle in Wachstum und Vermehrung der Tumorzellen spielen (De Weers et al., 2011). Gemäß diesen Erfordernissen zeigt CD38 sein therapeutisches Potenzial als Zielantigen insbesondere im Hinblick auf das MM und die CLL.

In der Behandlung von Krebserkrankungen des B-Zellkreises konnten seit der klinischen Etablierung von Rituximab, einem chimerischen Antikörper gegen CD20, entscheidende Verbesserungen in der Therapie erzielt werden. Für die Behandlung des MM hat Rituximab nur einen limitierten Effekt, da B-Zellen ihre CD20-Expression während ihrer terminalen Differenzierung in Plasmazellen verlieren (De Weers et al., 2011). Immunmodulierenden Substanzen (IMiDs) und Proteasomeninhibitoren konnten die mediane Überlebenszeit der an MM erkrankten Personen verlängern, stoßen jedoch zunehmend auf Resistenzen. Da die malignen Plasmazellen im Knochenmark infundierten Antikörpern gut zugänglich sind, wird weiterhin großes Potenzial in der Austestung diverser anderer Targets für toxinbeladene oder nackte Antikörper für die Immuntherapie gesehen (Sherbenou et al., 2014).

CD38 wird in hoher Dichte und Stabilität auf nahezu 100 % der Plasma- und Myelomzellen exprimiert und bietet als Target unkonjugierter Antikörper derzeit die besten Ergebnisse. Zwei CD38-Antikörper befinden sich in klinischen Studien. Der Antikörper SAR650984 zeigte in einer Phase-I-Dosis-Eskalation bei guter Tolerierung eine Ansprechrate (overall response rate, ORR) von 28 % bei 18 Teilnehmern und konnte in einer Phase-Ib-Kombinationsstudie mit Lenalidomid und Dexamethason eine ORR von 58 % bei multipel vorbehandelten Patienten erreichen. In präklinischen Studien hatte SAR650984 eine Antagonisierung der ADPR-Zyklasefähigkeit von CD38 gezeigt (Martin et al., 2013, Martin et al., 2014, Sherbenou et al., 2014, Deckert et al., 2014).

Der zweite Antikörper, Daratumumab, ein humaner anti-CD38 mAk, der durch die Immunisierung transgener Mäuse, die genetisch nur für humane Immunglobuline kodieren, generiert werden konnte, zeigte in vitro an Myelomzellen zytotoxische Effekte durch ADCC und CDC, außerdem Apoptose durch sekundäre Kreuzvernetzung sowie in vivo Aktivität gegen Myeloma-Zelllinien in Xenograft-Versuchen (Stevenson et al., 2006, De Weers et al., 2011, Jansen et al., 2012, Phipps et al., 2015). In Phase-I-Dosis-Eskalationsversuchen konnte bei guter Verträglichkeit eine ORR von 24 % bei 29 Teilnehmern erreicht werden (Plesner et al., 2012, Sherbenou et al., 2014). In einer Kombinationsstudie mit Lenalidomid und Dexamethason konnte eine ORR von 75 % erzielt werden, fünf Phase-III-Kombinationsstudien sind in Vorbereitung. Eine Phase-II-Studie mit 106 therapierefraktären Patienten, die durchschnittlich fünf Vortherapien mit IMiDs und Proteasomeninhibitoren erhalten hatten, zeigt als Teilergebnis für Daratumumab in einer Dosis von 16mg/kg Körpergewicht eine ORR von 29 %. Von einer Zulassung durch die FDA für die Therapie von refraktären oder rezidivierenden Myelomen im Jahr 2016 wird ausgegangen (Lonial et al., 2015). Die Potenz von Daratumumab zur Auslösung von CDC und ADCC wurde auf das Bindungsepitop des Antikörpers zurückgeführt (De Weers et al., 2011).

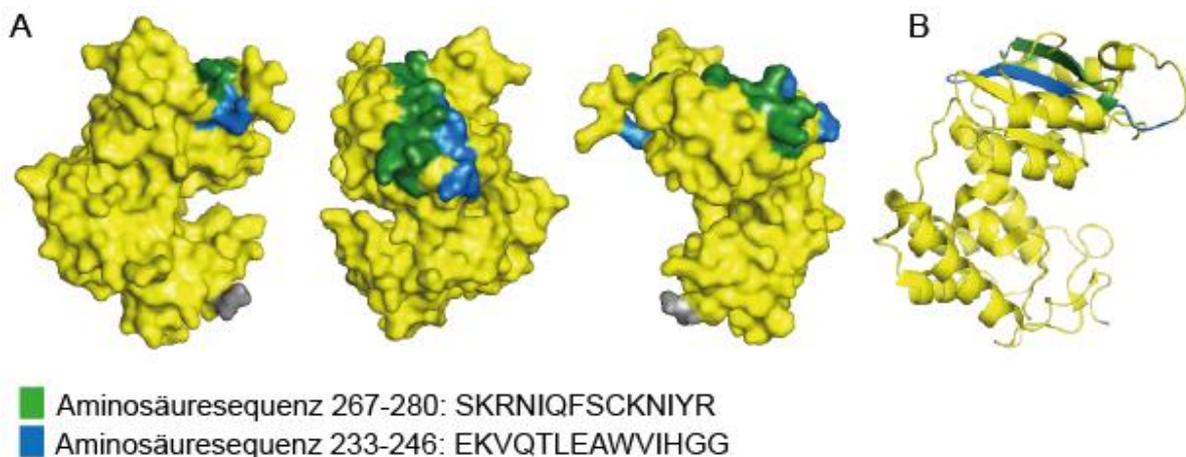


Abb. 1.8: Bindungsepitop Daratumumabs. (A) Van der Waals Oberfläche von CD38 und (B) Darstellung als Cartoon. Das Epitop Daratumumabs befindet sich auf zwei β -Faltblättern (grün und blau) im C-terminalen Bereich, deren Aminosäuresequenz angegeben ist (DeWeers et al., 2011). Der N-terminale Bereich ist in Grau markiert.

Bezüglich der CLL ist CD38 nicht nur ein Marker für eine schlechte Prognose, sondern auch ein zentraler Faktor in der Pathogenese. Hinweise auf das therapeutische Potenzial von CD38-spezifischen Antikörpern zeigen sich durch zytotoxische Wirkung auf CLL-Zelllinien in vitro. Aktivität im Sinne einer lebensverlängernden Wirkung konnte in Xenograft-Experimenten in vivo gezeigt werden (Matas-Céspedes et al., 2013). Obwohl insbesondere therapiebedürftige Patienten mit schlechtem Ansprechen auf vorherige Chemotherapien eine hohe Expression von CD38 aufweisen (Deaglio et al., 2008), ist das generelle Vorkommen

von CD38 bei CLL-Zellen nur moderat, daher wird ein Therapievorteil durch eine Stimulation der Expression diskutiert (Deaglio et al., 2008, Chillemi et al., 2013). Da der Promotor des Gens, welches für CD38 kodiert, sensibel für Retinsäure in therapeutisch zugelassenen Konzentrationen ist, zeigten alltrans Retinsäure (ATRA) und synthetische Derivate von Retinoiden (Tamibarotene) auf Myelom-Zelllinien einen Anstieg der CD38-Expression auf das 1,3- bis 6,1-fache, in CLL-Zellen konnte eine steigernde Wirkung bei CD38-positiven, nicht bei CD38-negativen Zellen beobachtet werden (Chillemi et al., 2013). Die forcierte Expression steigert allerdings die Aggressivität des Krankheitsverlaufs im Xenograft-Modell, ein Effekt, der nur durch enzymatisch kompetentes CD38 eintrat (Vaisitti et al., 2014). Eine Blockade der enzymatischen Funktionen von CD38 mit Kuromanin, einem Flavonoid, konnte in CLL-Zellen eine signifikante Beeinträchtigung der Rezirkulation von CLL-Zellen in Milz und Knochenmark bewirken. Insofern könnten sich bezüglich der CLL insbesondere enzyminhibierende, CD38-spezifische Antikörper als wirksame therapeutische Werkzeuge erweisen (Vaisitti et al., 2014).

Bedenken gegen eine In-vivo-Nutzung von CD38-Antikörpern, welche die weite Verbreitung von CD38 im Körper betrafen (Malavasi et al., 2011), haben sich in Bezug auf die Therapie als nicht limitierend erwiesen. Insbesondere in den Phase-I-Dosis-Eskalationsstudien konnte ein günstiges Wirkungsprofil Daratumumabs in Bezug auf Nebenwirkungen festgestellt werden (Plesner et al., 2012). ADCC konnte ausgelöst werden, ohne dass die Expression von CD38 auf den involvierten Effektorzellen einen Effekt auf ihre Funktion hatte. Auch eine Inhibition des Wachstums von Vorläuferzellen der erythrozytären und myeloiden Zellreihen im Knochenmark wurde nicht nachgewiesen (Stevenson et al., 2006, Tesar 2007, Deaglio et al., 2008).

Um die Spezifität für Myelomzellen zu verbessern, wurden Antikörperkonstrukte erstellt, die eine Bispezifität besitzen und neben CD38 mit CD138 ein zweites, für Myelomzellen typisches Oberflächenmolekül binden (Stevenson et al., 2006). Neben der Nutzung der Mechanismen der CDC und ADCC wird auch die Konjugation mit Radiopharmazeutika (Mehta et al., 2004) oder Toxinen (Bolognesi et al., 2005) erprobt, in der großes Potenzial gesehen wird (Van der Veer et al., 2011a, Sherbenou et al., 2014). Insbesondere die Wirkung von Lenalidomid, eines für die Behandlung des MM zugelassenen Chemotherapeutikums, könnte durch die Kombination mit einem Antikörper, der den Effekt des ADCC auslöst, potenziert werden, da durch Lenalidomid NK-Zellen stimuliert werden (Van der Veer et al., 2011a).

1.3 Schwereketten-Antikörper

Gegenüber den in der Immuntherapie bisher verwendeten konventionellen Antikörpern weisen Schwereketten-Antikörper strukturelle Unterschiede auf, die sich in einer vorteilhaften Pharmakokinetik auswirken und im Folgenden vorgestellt werden.

Konventionelle Antikörper bestehen aus zwei schweren Polypeptidketten mit einem Gewicht von 50kDa und zwei leichten Ketten mit einem Gewicht von jeweils 25kDa, die durch Disulfidbrücken verbunden sind. Sowohl schwere als auch leichte Ketten besitzen N-terminal eine Domäne von ungefähr 110 AS, die sich durch hohe Sequenzvariabilität auszeichnet und als variable Domäne der leichten (VL) bzw. schweren (VH) Kette bezeichnet wird. Zusätzlich enthalten die leichten Ketten noch eine, die schweren Ketten drei konstante Domänen, die innerhalb eines Isotyps identisch sind und daher als konstante Domänen der leichten (CL) bzw. der schweren (vom N-terminalen Ende aus gezählt; CH1, CH2 und CH3) Kette bezeichnet werden (Murphy, 2008).

Die V-Domänen der schweren und leichten Ketten bilden zusammen den variablen Bereich des Antikörpers, der an den Spitzen der Arme des Y lokalisiert ist und die Interaktion mit dem entsprechenden Antigen determiniert. Durch diesen aus β -Faltblättern bestehenden Bereich entsteht ein flexibles Grundgerüst für die Antigenerkennung. Jede Kette besitzt innerhalb dieses Gerüsts drei Regionen, complementary determining regions (CDR), die sich an den nach außen gerichteten Enden der V-Domänen schlaufenförmig zwischen den β -Faltblättern befinden. Die Antigenspezifität wird durch ihre hypervariablen Sequenzen bestimmt, wobei der CDR3 die größte Beteiligung zugesprochen wird (De Genst et al., 2006).

Zusätzlich zu den konventionellen Antikörpern bildet die Säugetierfamilie der Camelidae, zu der die Gruppen der Altwelt- und der Neuweltkamele gehören, eine Klasse von Antikörpern, denen die leichten Ketten sowie das CH1-Fragment der schweren Ketten fehlen und die daher nur ein Molekulargewicht von 90 kDa aufweisen und als Schwereketten-Antikörper bezeichnet werden (Wesolowski et al., 2009). Bei Altweltkamelen liegt der Anteil der Schwereketten-Antikörper im Serum bei 50-80 % der Immunglobuline, bei den Neuweltkamelen der Lamas und Alpakas bei bis zu 50 % (Maass et al., 2007, Muyldermans, 2013).

Die Antigenbindungsstelle der Schwereketten-Antikörper wird von einer singulären Domäne gebildet, der VHH (variable heavy domain of heavy chain antibodies). Diese ist über eine *hinge*-Region mit der CH2- und CH3-Domäne verbunden. Schwereketten-Antikörper existieren in zwei Isotypen, die sich durch die Länge der *hinge*-Regionen zwischen VHH und CH2 unterscheiden, *long hinge* bzw. *short hinge* (Hamers-Casterman et al., 1993). Isolierte VHHs werden auch Nanobodies genannt, da sie mit einer Masse von 15 kDa die kleinsten

antigenbindenden Einheiten darstellen (Muyldermans et al., 1994). Bei herkömmlichen Antikörpern ist ein Fusionsprotein aus variabler Domäne der schweren Kette (VH) und variabler Domäne der leichten Kette (VL) als Einzelketten-Variablen-Fragment (single chain variable fragment, scFv) die kleinste zur Antigenbindung fähige Einheit (Huston et al., 1991).

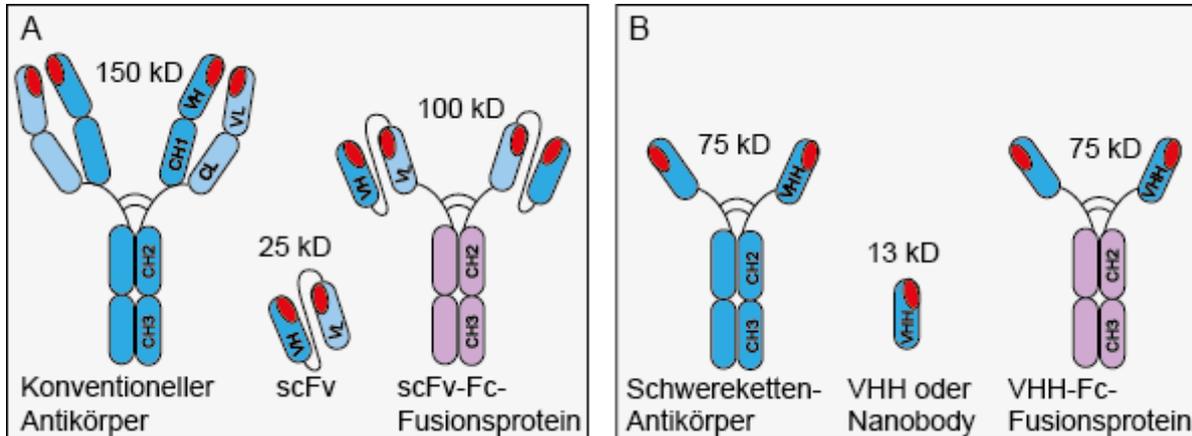


Abb. 1.9: Vergleich der Strukturen von konventionellen Antikörpern und Schwereketten-Antikörpern. (A) Konventionelle Antikörper werden aus zwei schweren und zwei leichten Polypeptidketten und das Paratop (rot) aus der variablen leichten (VL) und der variablen schweren Domäne (VH) gebildet. Die kleinste stabile antigenbindende Einheit ist ein variables Einzelketten-Fragment (single chain variable fragment, scFv), ein Fusionsprotein aus VH und VL, verbunden mit einem Linker. Bei scFv-Fc-Fusionsproteinen wird die antigenbindende Einheit mit einem allogenen oder xenogenen Fc-Anteil gekoppelt. **(B) Schwereketten-Antikörper aus Kameliden** haben keine leichte Kette und CH1-Domäne der schweren Kette, ihr Paratop (rot) wird durch eine einzige Domäne der schweren Kette (VHH) gebildet. VHHs sind die kleinsten stabilen antigenbindenden Einheiten, die Kopplung an einen xenogenen Fc-Anteil zur Bildung eines VHH-Fc-Fusionsproteins ist möglich.

Die VHH eines Schwereketten-Antikörpers besitzt gegenüber der VH konventioneller Antikörper strukturelle Unterschiede. Die für die Interaktion mit der VL elementaren punktuellen Häufungen hydrophober AS (Val47, Gly49, Leu50, Trp5) in der VH der konventionellen Antikörper sind in den VHH durch hydrophile AS (zumeist Phe42, Glu49, Arg50, Gly52) substituiert, die eine höhere Löslichkeit bedingen (Muyldermans et al., 2013, Wesolowski, et al., 2009). Auch VHHs besitzen als Ort der spezifischen Antigenbindung drei CDRs, die von stärker konservierten framework regions (FR) in Form von β -Faltblättern umgeben sind. FR1 und FR3 sind durch eine kanonische Disulfidbrücke miteinander verbunden. Die CDR3 ist bei VHHs deutlich verlängert gegenüber konventionellen Antikörpern und wird in Lama-VHHs zur Stabilisierung teilweise durch eine weitere Disulfidbrücke mit der CDR2-Schleife verbunden (Wesolowski et al., 2009, Desmyter et al., 2001, Koch-Nolte et al., 2007). Die verlängerte CDR3 bildet im Vergleich zur flachen, molekularen Bindung der variablen Domänen klassischer Antikörper fingerförmige Ausstülpungen, mit denen Strukturen des Antigens erkannt werden können, die für klassische Antikörper nicht erreichbar sind.

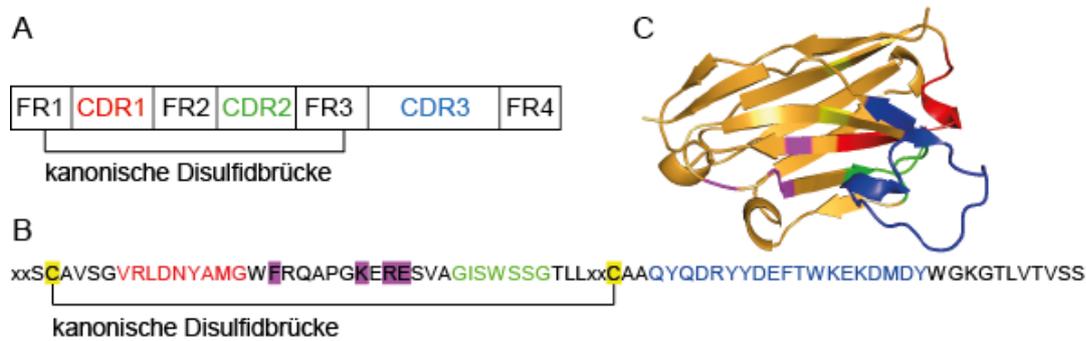


Abb. 1.10: Strukturelle Besonderheiten von VHHs. (A) Schematische Darstellung der drei CDR-Regionen der VHHs, die an der Antigenbindung beteiligt sind, diese sind von framework-Regionen (FR1-FR4) umgeben. Abweichend von VHs konventioneller Antikörper kann bei VHHs neben der kanonischen Disulfidbrücke zwischen FR1 und FR3 eine optionale Disulfidbrücke zwischen CDR2 und CDR3 auftreten. Die CDR3-Region ist verlängert mit der Möglichkeit der Bindung tiefer liegender Epitope. In der FR2 befinden sich hydrophile Aminosäuren (magenta), welche die Löslichkeit der VHHs verbessern. **Darstellung des CD38-spezifischen Einzeldomänenantikörpers L-19.1 (B) als Aminosäuresequenz in verkürzter Form und (C) als Cartoon.** Die CDR1 ist in Rot, CDR2 in Grün, CDR3 in Blau, die hydrophilen AS in Magenta und Disulfidbrücken in Gelb dargestellt.

Ihre strukturellen Besonderheiten prädestinieren VHHs für einen breiten Einsatz in Forschung und diagnostischer sowie therapeutischer Anwendung. Aufgrund ihrer geringen Größe und des monovalenten Formats können VHHs in bi- oder multispezifische Konstrukte überführt werden, die verschiedene Epitope desselben Antigens oder verschiedener Antigene erkennen, sodass Affinität und Avidität gesteigert werden (Muyldermans et al., 2013). Durch die Fusion von zwei TNF α -spezifischen mit einer Albumin-spezifischen VHH konnte ein trimeres Konstrukt erzeugt werden, dessen In-vivo-Halbwertszeit verlängert werden konnte (Kratz, Elsadek 2012, Tijink et al., 2008). Ein weiterer Vorteil der VHHs besteht in ihrer geringen Immunogenität (Cortez-Retamozo et al., 2004). Therapierrelevante Immunabwehrprozesse können durch die Fusionierung mit Fc-Segmenten über den Mechanismus der antikörperabhängigen Zytotoxizität (Bell et al., 2010) oder der komplementabhängigen Zytolyse (Tang et al., 2013) induziert werden. In der In-vivo-Bildgebung sind VHHs durch ihre erleichterte Gewebepenetration und renale Elimination optimale Werkzeuge (Chakravarty et al., 2014, Bannas et al., 2014), selbst intrazelluläre Anwendungen, wie die Visualisierung von Zielproteinen in lebenden Zellen, konnten realisiert werden (Rothbauer et al., 2006, Zolghadr et al., 2012).

Schwereketten-Antikörper werden durch die Immunisierung von Kameliden mit dem Zielprotein und einem Adjuvant generiert oder es erfolgt eine DNA-Immunisierung mit einer Genpistole (Koch-Nolte et al., 2007). Durch die Wiederholung dieses Vorgangs erfolgt eine Affinitätsreifung der VHHs. Aus der cDNA peripherer Blutlymphozyten, die nach Präparation

und reverser Transkription der RNA gewonnen wird, kann mit VHH-spezifischen Primern das Immunrepertoire der VHHS mittels PCR amplifiziert und in Phagemid-Vektoren kloniert werden (Muyldermans 2013, Wesolowski et al., 2009). Durch Transformation des Vektors in *E.coli* und Superinfektion mit Helferphagen werden neue Phagen gebildet, welche die DNA der VHHS mit dem Phagemid in sich tragen und in deren Außenhülle die funktionellen Antikörperfragmente integriert sind. Aus den entstehenden Phagenbibliotheken können aufgrund der Kopplung von Geno- und Phänotyp antigenspezifische VHHS selektioniert, sequenziert und charakterisiert werden (Wesolowski, et al., 2009). Die Produktion erfolgt rekombinant in pro- und eukaryotischen Zellen und ermöglicht hohe Ausbeuten.

1.3.1 Herstellung von CD38-spezifischen VHHS aus den Lamas 10, 25, 538 und 539

Für die Induktion von anti-CD38 Schwereketten-Antikörpern wurden durch die AG Nolte vier Lamas nach unterschiedlichen Schemata immunisiert. Zwei Lamas erhielten rekombinant hergestelltes, deglykosyliertes, humanes CD38 aus Insektenzellen (Unger 2012), zwei weitere Lamas erhielten sowohl für humanes als auch für murines CD38 kodierende, Goldgekoppelte Plasmid-DNA durch Behandlung mit einer Genpistole und im weiteren Verlauf eine Proteinzufuhr mit einer Mischung der nativen, glykosylierten Membranproteine des humanen und murinen CD38 (Menzel, 2014).

Aus den Seren wurden mittels sequenzieller Protein-G- und Protein-A-Chromatographie die verschiedenen IgG-Subklassen des Lamas isoliert, um die CD38-spezifische Immunantwort zu überprüfen. Nach der Isolierung der RNA aus den Lymphozyten der immunisierten Lamas wurde eine cDNA-Synthese durchgeführt und mittels spezifischer Oligonukleotide das Immunrepertoire PCR-amplifiziert. Über die Restriktionsschnittstellen SfiI und NotI bzw. BstEII wurden die DNA-Fragmente in den Phagen-Display-Vektor pHEN2 kloniert, und nach Transformation des Vektors in *E.coli* und Koinfektion mit Helferphagen eine Phagenbibliotheken generiert. Während durch das Restriktionsenzym NotI die *hinge*-Region Teil der VHH bleibt, wird durch die Schnittstelle von BstEII diese Region von der VHH abgetrennt, sodass sie im weiteren Verlauf ohne *hinge* auftritt bzw. nicht mehr nach diesem Merkmal charakterisiert werden kann.

Für die Lamas 10 und 25 wurden mittels Panning-Phagen an immobilisiertem CD38 sowie auf der Oberfläche von CD38-transfizierten NIH-3T3 Zellen selektiert und die in den Phagen enthaltene VHH-DNA isoliert. Die Bibliotheken wurden zwei bis drei Selektionsrunden unterzogen. Nach jeder Runde wurden zwölf Klone sequenziert, um eine Anreicherung spezifischer Klone nachzuweisen. Klone, die häufiger als einmal oder von denen mehrere Klone mit wenigen Aminosäuresubstitutionen in den CDR-Regionen gefunden werden

konnten, wurden als Familie definiert. Es konnten neun Familien aus Lama 10 und sechs Familien aus Lama 25 selektiert werden (Unger, 2012).

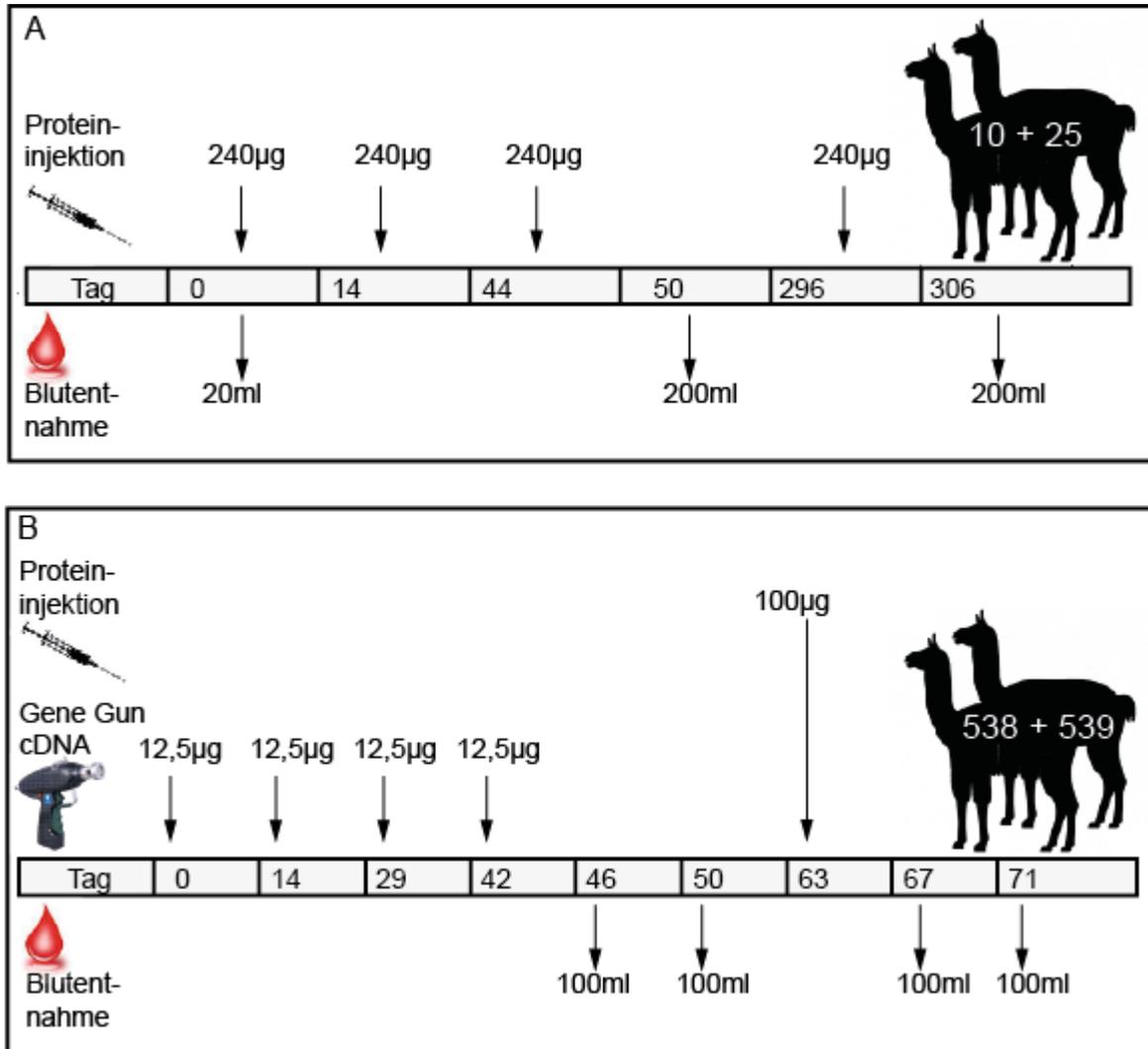


Abb. 1.11: Immunisierungsschemata. (A) Die Lamas 10 und 25 erhielten an vier Terminen rekombinant hergestelltes, deglykosyliertes, humanes CD38 aus Insektenzellen durch eine subkutane Injektion in den Hals. Phagenbibliotheken wurden aus den Blutentnahmen nach dem 2. und 3. Boost erstellt (Unger, 2012). **(B) Die Lamas 538 und 539** erhielten viermalig humanes und murines CD38 in Form von Gold-gekoppelter Plasmid-DNA mit einer Genpistole und eine einmalige Proteininjektion mit einer Mischung der nativen, glykosylierten Membranproteine des humanen und murinen CD38. Phagenbibliotheken wurden aus den Blutentnahmen am 71. Tag erstellt (Menzel, 2014).

1.4 Zielsetzung

Durch die antikörperbasierte Krebsimmuntherapie konnten in den letzten Jahren bedeutende Fortschritte in der Diagnostik und Behandlung von Erkrankungen wie dem Non-Hodgkin-Lymphom oder Brustkrebs erzielt werden. Die Chronisch Lymphatische Leukämie und das Multiple Myelom sind noch immer unheilbare Erkrankungen, deren Überlebensrate bei aggressiven Formen deutlich unter fünf Jahren liegt. Bezüglich dieser Krankheiten konnte mit dem multifunktionalen Enzym und Rezeptor CD38 ein hochexprimierter Marker identifiziert werden, dessen Vorkommen auch kausal für die Pathogenese ist. CD38-spezifische, konventionelle Antikörper zeigen zurzeit in klinischen Studien erfolgversprechende Ergebnisse durch ihre Funktion als Initiator von Prozessen der Immunabwehr. VHHs haben gegenüber konventionellen Antikörpern vielfältige Vorteile. Diese Arbeit widmet sich daher der Selektionierung und Charakterisierung von CD38-spezifischen VHHs, ihrer Umklonierung in ein zur Auslösung von Immunantworten befähigtes Format und der Analyse dieser VHH-Fc-Fusionsproteine bezüglich ihres Potenzials zur Induktion von CDC.

2 Material

2.1 Laborgeräte

<u>Autoklav</u>	<u>Firma</u>
Autoklav Modell 2540 EK	Tuttnauer Europe
Autoklav Varioklav	H+P Labortechnik GmbH

<u>Brutschränke und Inkubatoren</u>	<u>Firma</u>
Brutschrank CO2 Inkubator MCO-20AIC	Sanyo Electric Co.
Brutschrank Bakterien Incubat	Melag
Schüttelinkubator ECOTRON/UNITRON	inforsHT

<u>Durchflusszytometer</u>	<u>Firma</u>
FACSCanto II	Becton Dickinson

<u>Gelelektrophoresezubehör</u>	<u>Firma</u>
Laufkammern Agarose-Gelelektrophorese	PEQLAB Biotechnologie GmbH
SDS-PAGE Novex MiniCell	Invitrogen
Spannungsgerät Agarose Gelelektrophorese	Bio-Rad
Spannungsgerät SDS-PAGE Power Pac 200	Bio-Rad

<u>Kühlaggregate</u>	<u>Firma</u>
Kühltruhe -80°C HFC 586 Basic	Eberline
Stickstofftank, Modell BI0105 LVD	Biometra

<u>Laborkleingeräte</u>	<u>Firma</u>
Axiovert 200M	Zeiss
Heizblock Thermomixer kompakt,	Eppendorf
IR-Lampe	Philips
Magnetrührer IKAMAG RH	Janke & Kunkel IKA Labortechnik
Mikrowelle M637 EC	Miele
Minishaker MS1	Wilke & Witzel
Neubauerzählkammer	Labor Optik
pH-Meter InLab Routine pro	Mettler
Pipetboy	Integra
Roller Mixer SRT6	Stuart
Scanner Canonscan 9800 F	Canon
Thermocycler T3/T Gradient	Biometra

Material

Vortex Mixer	neoLab
Wasserbad Typ 1007	Gesellschaft für Labortechnik

PCR Maschine

Firma

RealTime PCR System Step One Plus	Applied Biosystems
-----------------------------------	--------------------

Pipetten

Firma

Eppendorf Research 1000	Eppendorf
Eppendorf Research 200	Eppendorf
Eppendorf Research 100	Eppendorf
Eppendorf Research 20	Eppendorf
Eppendorf Research 10	Eppendorf
Eppendorf Research 300 Multikanal	Eppendorf
Pipettierhilfe Express	Falcon

Photometer

Firma

NanoTemper Monolith NT.115	Nanotemper
Photometer Ultraspec 2000	Pharmacia Biotech
Photometer SmartSpec 3000	Bio-Rad
Spektrophotometer Nanodrop 2000c	PEQLAB Biotechnologie GmbH

Sterile Werkbank

Firma

HeraSafe HS12/2	Heraeus
Reine Werkbank Gelaire Typ BSB4	Gelman

Waagen

Firma

Analysenwaage Analytical Plus	Ohaus
Feinwaage Typ 1412	Sartorius

Zentrifugen

Firma

Biofuge pico	Heraeus
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf
Rotanta 460R	Hettich
Tischzentrifuge 5424	Eppendorf
TSpin	Promega
Zentrifugen Rotoren SA-300/SLA-300	Sorvall

2.2 Reagenzsysteme

Material	Firma
Alexa Fluor-647 Protein Labeling Kit	Molecular Probes
Alexa Fluor-680 Protein Labeling Kit	Molecular Probes
Endofree Plasmid Maxi Kit	Qiagen
Gelextraktion Nucleospin Extract II	Macherey-Nagel
PCR-Aufreinigung Nucleospin Extract II	Macherey-Nagel
Plasmid-Präparation QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
SDS-PAGE-Färbung Colloidal Blue Staining Kit	Invitrogen
Xcell II-MiniCell System	Invitrogen

2.3 Chemikalien

Chemikalie	Firma
2xYT	BD/Difco
Agar	BD/Difco
AEBSF	Sigma
Agarose	Invitrogen
Aqua ad iniectabilia	Braun
Bacto-Agar	Gibco-BRL
Bacto-Hefeextrakt	Gibco-BRL
Bacto-Trypton	Gibco-BRL
BSA	PAA
Carbenicillin	Serva
DNA-Ladepuffer, 6x	Fermentas
dNTPs	Invitrogen
DTT	Invitrogen
EDTA	Sigma
Ethanol, reinst, getrocknet	Merck
Ethanol, vergällt	Walter CMP GmbH
Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom
Gel-Dry Drying Solution	Invitrogen
Hepes 1M	Gibco
IPTG 1M	Thermo Fisher Scientific Biosciences
Jetpei	Polyplus

Material

Kanamycin	Novagen
KOD-Buffer	Novagen
L-Glutamin	Gibco
LB Agar	BD/Difco
LB Broth	BD/Difco
Lysozym	Roche
Magermilchpulver	Roth
Methanol	Walther
MgSO ₄	Novagen
NAD	Sigma
Natriumchlorid	Sigma
Natriumhydrogencarbonat	Sigma
Nicht-essenzielle Aminosäuren, 100x	Gibco
NuPAGE antioxidant	Invitrogen
NuPAGE sample reducing agent, 10x	Invitrogen
NuPAGE SDS-PAGE sample buffer, 4x	Invitrogen
PBS	Gibco
Pluronic	BASF
Propidiumiodid	Sigmar
Roti-safe	Roth
RPMI 1640	Gibco
Sucrose	Merck
TAE, DNA typing grade, 50x	Invitrogen
Terrific broth	USB Corp
Triton X-100	Serva
Trypsin, 10x	Invitrogen
Tween-20	ICI-Americas

2.4 Medien

<u>Medium</u>	<u>Zusammensetzung</u>
2xYT	31g/l in de-ionisiertem Wasser
2xYT-Agar	2xYT, 15g Agar
2xYT-Carb	2xYT mit 100µg/ml Carbenicillin
F17-Transfektionsmedium	Gibco F17, 4mM L-Glutamin, 0,1 % Pluronic
F17-Komplettmedium	F17-Transfektionsmedium, 1 % FCS
0,5 % G418	
F17 feeding medium	F17-Transfektionsmedium, 20 % Trypton
LB	25g/l in de-ionisiertem Wasser
LB Agar	30,5g/l in de-ionisiertem Wasser
RPMI Komplettmedium	500ml RPMI-1640, 5ml Glutamin, 5ml Natriumpyruvat, 5ml Hapes, 5ml nicht-essenzielle Aminosäuren, 25ml FCS, 0,1 % Pluronic
SOC-Medium	0,5 % Hefeextrakt, 2 % Trypton, 10mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10mM MgSO ₄ , 20mM Glukose

2.5 Puffer

<u>Puffer</u>	<u>Zusammensetzung</u>
Puffer für Bakterienlysate	
Lysepuffer	30 mM Tris-HCl, pH 8, 20 % Saccharose,
500 mM AEBSF, 1 % Lysozym	
Periplasmalysat-Puffer I	30 mM Tris-HCL, pH 8, Succrose,
500 mM AEBSF, EDTA	
Periplasmalysat-Puffer II	5 mM MgCl ₂ in H ₂ O
Puffer für die Affinitätschromatographie	
Elutionspuffer (250 mM Imidazol)	0,2 M NaH ₂ PO ₄ , 0,2M Na ₂ HPO ₄ , 0,3 M NaCl, 0,25 M Imidazol in H ₂ O
Elutionspuffer (0,1 M Glycin-HCl)	0,1 M Glycin-HCl in PBS, pH 2,7
Neutralisationspuffer (1 M Tris HCl)	1 M Tris HCl in PBS, pH 9,0
Puffer für Phagen-Display	
Block-Puffer 1	1 % Milchpulver in RPMI komplett

Material

Block-Puffer 2	1 % Milchpulver in PBS
PEG/NaCl	20 % PEG + 250 mM NaCl in H ₂ O

Puffer für Apoptose-Assay

Annexin V-Bindepuffer 10x	1,4 M NaCl, 25 mM CaCl ₂ , 0,1 M HEPES pH 7,4
---------------------------	---

2.6 Pro- und Eukaryotische Zelllinien

<u>Eukaryotische Zellen</u>	<u>Firma</u>	
humane Zellen		
HEK293-6E (embryonale Niere)	AG Koch-Nolte	
RPMI-8226 (Myelom-Zelllinie)	AG Koch-Nolte	
Daudi	(Lymphom-Zelllinie)	AG
	Koch-Nolte	
CA46 (Burkitt-Lymphom-Zelllinie)	AG Koch-Nolte	
U266 (Myelom-Zelllinie)	AG Koch-Nolte	
murine Zellen		
YAC HH ARTC2.2 (Lymphom-Zelllinie)	AG Koch-Nolte	
YAC ARTC2.2, hCD38 (Lymphom-Zelllinie)	AG Koch-Nolte	
DC27.10 ARTC2.2 (Lymphom-Zelllinie)	AG Koch-Nolte	
DC27.10 ARTC2.2, hCD38 (Lymphom-Zelllinie)	AG Koch-Nolte	
Prokaryotische Zellen		
<u>Prokaryotische Zellen</u>	<u>Firma</u>	
TG1 (<i>E.coli</i>)	Lucigen	
XL-2-Blue (<i>E.coli</i>)	Stratagene	
HB 2151 (<i>E.coli</i>)	Amersham Pharmacia Biotech	
XL-10-Gold (<i>E.coli</i>)	Stratagene	

2.7 Antikörper

<u>Antigen</u>	<u>Bezeichnung</u>	<u>Firma</u>
c-myc (A647)	9B11	Cell Signaling Technology
c-myc (FITC)	9E10	Serotec
murin ARTC2.2	s+16a	AG Koch-Nolte
e-NAD (A647)	1G4	AG Koch-Nolte
P2X7	13A7	AG Koch-Nolte
murinCD38 (PE)	90	BioLegend
humanCD38 (PE)	HIT2	BD Biosciences
humanCD38 (FITC)	IA10	BD Biosciences
humanCD38, VHH	1067 (L-19.2)	AG Koch-Nolte
IgG (FITC)	-	Dianova
Annexin V	-	BioLeg
ADAM17, scFv-Fc	D1A12	AG Koch-Nolte
IL4, scFv-Fc	-	AG Koch-Nolte

2.8 Enzyme

<u>Enzym</u>	<u>Firma</u>
Sfil	New England Biolabs GmbH (NEB)
NcoI	NEB
NotI	NEB
PciI	NEB
Antarktische Phosphatase	NEB
KOD Hot Start Polymerase	Novagen
SuperscriptIII Reverse Transkriptase	Invitrogen
KOD-DNA-Polymerase	Merck KgaA

2.9 Vektoren

<u>Vektor</u>	<u>Firma</u>
pHEN2	zur Verfügung gestellt von Dr. Fernando Goldbaum, Instituto Leloir, Buenos Aires, Argentinien
pCSE2.5	zur Verfügung gestellt von Dr. Thomas Schirrmann, Braunschweig
pMA-T	GeneArt Life Technologies

2.10 Affinitätsmatrizes

<u>Matrix</u>	<u>Firma</u>
Protein G Sepharose 4 Fast Flow	GE Healthcare
Ni-NTA-Agarose	QIAGEN GmbH

2.11 Protein- und DNA-Größenstandards

<u>Standard</u>	<u>Firma</u>
GeneRuler 1 kb DNA ladder	Fermentas
Smart Ladder	Eurogentec
Supermarker SM (Protein)	AG Koch-Nolte: 75 µg/ml IgG, 100 µg/ml BSA, 10 µg/ml Lysozym

2.12 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Metabion GmbH für angewandte Biotechnologie synthetisiert:

<u>Name</u>	<u>Sequenz</u>
1067_68 (pCSE2.5 forward)	TCGGACATGTCCGATGTGCAGCTGCA
JKo#29 (pCSE2.5 forward)	CGGACATGTTCGCAGGTGCAGCTGCA
Fdseq1 (pHEN2 reverse)	GAATTTTCTGTATGAGG
LMB3 (pHEN2 forward)	CAGGAAACAGCTATGAC
CMV-F (pHEN2 forward)	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR dient der exponentiellen Amplifikation eines DNA-Segments durch zyklische Wiederholung eines dreiteiligen Prozesses. Im ersten Schritt wird der zu amplifizierende DNA-Doppelstrang bei 95 °C denaturiert, damit sich im nächsten Schritt im PCR-Ansatz enthaltene synthetische Oligonukleotide (Primer) an ihre komplementären DNA-Fragmente, welche die zu amplifizierende Sequenz flankieren, anheften können (Annealing). Im Elongationsschritt synthetisiert die hitzestabile KOD-DNA-Polymerase bei 70 °C den Komplementärstrang aus freien dNTPs.

Verwendet wurden Ansätze von 20 µl mit folgender Zusammensetzung und Konzentration:

2	µl	10xPuffer für KOD-Polymerase
1,2	µl	MgSO ₄ (1,5 mM)
2	µl	dNTPs (10 mM)
1	µl	forward primer (10 mM)
1	µl	reverse primer (10 mM)
0,5	µl	KOD-DNA-Polymerase (1 U/µl)
x	µl	DNA (ca. 1 ng)
x	µl	ddH ₂ O ad 20 µl

Die PCR wurde im Thermocycler mit folgendem Programm durchgeführt:

1.	Primärdenaturierung	95 °C	2 min	
2.	Denaturierung	95 °C	20 s	Schritte 2. bis 4.
3.	Annealing	58 °C	10 s	wurden 30x
4.	Elongation	70 °C	15 s	wiederholt
5.	Finale Elongation	70 °C	7 min	

Das Programm pausierte bei einer Temperatur von 4 °C.

3.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Mittels Agarose-Gelelektrophorese werden DNA- und RNA-Moleküle durch ihr Wanderungsverhalten in einem elektrischen Feld größenfraktioniert und isoliert. Es wurden 1 %ige Agarosegele gefertigt, indem Agarose unter Erhitzen in 50 oder 100 ml TRIS-Acetat-

EDTA(TAE)-Puffer gelöst und zum Auskühlen in eine Gelkammer gegossen wurde. Zur Anfärbung der DNA wurden 2,5 bzw. 5 µl Roti-Safe hinzugefügt. Nach Aushärtung des Gels erfolgte die Überführung in eine mit TAE-Puffer gefüllte Laufkammer. Die zu untersuchenden Proben wurden mit 6xDNA-Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die verwendeten Farbstoffe Bromphenolblau und Xylencyanol des Ladepuffers dienen der Visualisierung der Lauffront zur Kontrolle des Prozesses. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 90–120 V für 40–90 Minuten. Die Dokumentation wurde durch einen UV-Transilluminator ermöglicht, der die Bindung des Roti-Safe-Reagenzes an die DNA mit einem Video-Image-System festhielt und durch mitlaufende DNA-Standards eine Analyse erlaubte. Bei geplanter Weiterverwendung der Proben wurden diese zuvor aus den Gelen extrahiert.

3.1.3 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Zur Weiterverwendung gelelektrophoretisch isolierter DNA wurde die Extraktion aus Agarosegelen mithilfe des Gelextraktion Kits NucleoSpin Extract II von Macherey-Nagel entsprechend den Herstellerangaben vollzogen. Nach Auflösung der Agarose konnte durch die selektive Adsorption von Nukleinsäuren an eine Silizium-Matrix in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen die anschließende Elution in einer Lösung geringer Salzkonzentration oder ddH₂O erfolgen.

3.1.4 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Durch Spektrophotometrie wurde die Konzentration aufgereinigter DNA überprüft, deren Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm liegt, und mithilfe des Faktors $A_{260}=1=50 \mu\text{g/ml}$ in die Konzentration umgerechnet. Gemessen wurde bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm, um durch das Verhältnis der Absorptionen die Reinheit der DNA zu bestimmen, wobei ein Wert von $A_{260}/A_{280}=1,8-2,0$ als ausreichend rein bewertet wurde. Ein geringerer Wert gibt Aufschluss über die Verunreinigung mit Proteinen, deren Absorptionsmaximum bei A280 liegt.

3.1.5 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Durch Restriktionsendonukleasen kann DNA bevorzugt innerhalb einer palindromischen Erkennungssequenz geschnitten werden, um definierte Fragmente zu isolieren. Dieser Restriktionsverdau erfolgte mit den jeweils passenden Restriktionsendonukleasen und Puffern des Herstellers New England Biolabs GmbH (NEB) unter Einhaltung der empfohlenen Temperaturen und Pufferbedingungen. Reaktionsansätze enthielten jeweils 1 µl der Enzyme NcoI und NotI bzw. PciI und NotI, 2 µl Puffer NEB 3, 2 µl BSA, 0,5-3 µg

DNA und ddH₂O ad 20 µl. Die Spaltung der DNA erfolgte für drei bis sieben Stunden bei 37 °C, gefolgt von einer Hitzeinaktivierung der Enzyme bei 65 °C für 20 Minuten.

3.1.6 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Zur Vermeidung der spontanen Religation und Rezyklisierung von restriktionsverdauten Plasmiden wurden diese endständig dephosphoryliert. Für 0,5-3 µg DNA wurden 1 µl Antarctic Phosphatase (1 U/µl) und 2,2 µl 10xPuffer von NEB verwendet und einer einstündigen Inkubation bei 37 °C unterzogen. Im Anschluss erfolgte die Inaktivierung des Enzyms für 20 Minuten bei 65 °C.

3.1.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Durch eine Ligation werden DNA-Enden zweier Fragmente verbunden, indem eine Ligase die Verknüpfung der 5'-Phosphatgruppe und der 3'-Hydroxygruppe unter ATP-Verbrauch katalysiert. Um DNA-Inserts in Plasmidvektoren einzubringen, kamen T4-Ligase und ein entsprechender Puffer der Firma NEB zur Verwendung. Für die Ligation wurden 50 ng des Vektors, 15 ng des Inserts, 1 µl Ligase und 2 µl Puffer in einem Volumen von 10 µl gewählt. Die Reaktion erfolgte für 16 Stunden bei 16 °C gefolgt von einer Hitzeinaktivierung der Ligase bei 65 °C für zehn Minuten.

3.1.8 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde von der Firma SeqLab (Göttingen) durchgeführt. Hierfür wurden 600–700 ng der Plasmid-DNA mit 20 pmol der spezifischen Primer und ddH₂O in einem Volumen von 7 µl angesetzt.

3.1.9 Transformation kompetenter *E.coli*-Zellen

Die chemisch kompetenten Zellen wurden aus der Lagerung bei -80 °C entnommen und auf Eis aufgetaut. Ligationsprodukte wurden zur Vervielfältigung in kompetente *E.coli*-XL-2-Blue- oder *E.coli*-XL-10-Gold-Bakterien transformiert, für die periplasmatische Expression von VHHs in *E.coli* wurde der Stamm HB2151 mit dem Vektor pHEN2 verwendet. 30-50 µl der Bakterien wurden nach Zugabe von 1-2 µl DNA für 30 Minuten auf Eis inkubiert, im Anschluß einem Hitzeschock im Wasserbad für 30 Sekunden bei 42 °C ausgesetzt, und nach erneuter Inkubation für zwei Minuten auf Eis wurde 270-450 µl vorgewärmtes SOC-Medium (1/10 Verdünnung des Ansatzes) zugegeben. Die Ansätze wurden für eine Stunde bei 37 °C und 240 rpm inkubiert. Definierte Proben dieser Ansätze wurden auf 2xYT-Carb-Agarplatten unter sterilen Bedingungen ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

3.1.10 Kultivierung von Bakterien und Lagerung von Bakterien-Kolonien

E.coli-Kolonien auf Agarplatten wurden mit Parafilm abgedichtet und invertiert bei 4 °C bis zu vier Wochen gelagert. Für die Kultivierung wurden Einzelklone gepickt und damit Medium mit 100 µg/ml Carbenicillin angeimpft. Vorkulturen wurden über Nacht bei 37 °C und 240 rpm inkubiert, Hauptkulturen wurden mit den Vorkulturen angeimpft und unter denselben Bedingungen weitere drei bis sechs Stunden inkubiert. Als Medien wurden LB-Carb oder 2xYT-Medium verwendet und maximal zwei Wochen bei 4 °C gelagert. Zur Langzeitlagerung wurden 700 µl einer Bakterienkultur mit 300 µl Glycerol in einem Kryo-Röhrchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei - 80 °C gelagert.

3.1.11 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien mit kommerziell erhältlichen Kits

Die Isolierung und Aufreinigung von DNA aus 5 ml Bakterienvorkulturen oder 100 ml Hauptkulturen wurde mithilfe des Spin Miniprep oder Maxiprep Kits der Firma Qiagen nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.2 Phagen-Display-Technologie

3.2.1 Prinzip des Phagen-Displays

Um Antikörper oder VHHs einer Antigen-Spezifität aus Immunbibliotheken zu identifizieren und zu isolieren, wird die Methode des Phagen-Displays angewandt. Die Technologie bedient sich des Mediums der Bakteriophagen, da in Phagen der Oberflächen-exprimierte Phänotyp und der im Phagemid enthaltene Genotyp der Antikörperfragmente gekoppelt sind (McCafferty et al., 1990). Das Immunrepertoire der von der Firma Ablynx immunisierten Lamas wurde zu diesem Zweck mit VHH-spezifischen Primern amplifiziert und in den Phagemidvektor pHEN2 kloniert. Durch Transformation von TG1-*E.coli* wurden primäre Bakterienbibliotheken erstellt. Zur Generierung von Phagenbibliotheken erfolgte eine Superinfektion von Proben der Bakterienbibliotheken mit den Helferphagen M13K07. Da das zur Bildung intakter, virulenter Phagen benötigte gIII-Hüllprotein im Genom der Helferphagen fehlt, aber im Phagemid in Fusion mit dem Antikörperfragment vorliegt, ist gewährleistet, dass nur *E.coli*, die Helferphagengenom und Phagemid aufgenommen haben, intakte Phagen produzieren können.

3.2.2 Selektion an Antigen-exprimierenden Zellen

Um aus den erstellten Phagenbibliotheken über Wechselwirkungen mit dem Antigen spezifische Phagen zu selektionieren und die kodierende DNA zu gewinnen, wurden

zunächst 200 µl der Phagenbibliothek in einem Verhältnis von 1:9 eine Stunde bei Raumtemperatur in Block-Puffer I (auf RPMI-Basis, 1 % Milchpulver) vorinkubiert, um durch die Blockade freier Bindungsstellen unspezifische Bindungen zu minimieren. Es folgte eine Negativselektion mit der Zelllinie U266, die in nur geringem Maße hCD38 exprimiert. Phagen, die an andere Oberflächenproteine binden, sollten durch diese Präabsorption entfernt werden. 1×10^7 U266-Zellen wurden für fünf Minuten bei 2500 rpm zentrifugiert und zusammen mit den Phagen eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden im Anschluss pelletiert (1300 rpm, fünf Minuten, 4 °C). Der Überstand wurde zu 1×10^7 hCD38-hochexprimierenden CA46-Lymphomzellen gegeben und für zwei weitere Stunde inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Zellen unter dreimaligem Wechsel des Gefäßes zweimal mit Block-Puffer I, dreimal mit Block-Puffer II (auf PBS-/-Basis, 1 % Milchpulver) und fünfmal mit PBS -/- gewaschen, um anschließend mit den gebundenen Phagen pelletiert zu werden. Zur Elution der Phagen wurden die Zellen in 500 µl 1xTrypsin aufgenommen, zehn Minuten inkubiert und anschließend fünf Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die im Überstand befindlichen Phagen wurden abgenommen, auf 50 µl vorgelegtes AEBSF pipettiert und zur Reinfektion verwendet.

3.2.3 Reinfektion

Nach der Selektion folgte die erneute Einbringung der rekombinanten Phagen des Eluates in den zellulären Wirtsorganismus *E.coli*, wofür der F-Pilus tragende *E.coli* Suppressor Stamm TG1 verwendet wurde. 5 ml einer Kultur mit einer optischen Dichte von OD=0,5 wurden mit 250 µl Phagen-Eluat infiziert und 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach einer Stunde wurden die Zellen pelletiert (4.000 rpm, zehn Minuten, 4 °C), auf 2xYT-Carb-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank kultiviert.

3.2.4 Amplifikation selektierter Phagen

Die auf den Agarplatten gewachsenen Klone wurden gezählt und einige Klone gepickt. Die Bakterien wurden unter Zugabe von 20 ml 2xYT-Carb-20 %Gly mit dem Zellschaber von den Platten gelöst und 30 Minuten suspendiert. 50 µl wurden abgenommen und zur weiteren Phagenproduktion verwendet. Der Rest wurde bei 4.600 rpm für zehn Minuten zentrifugiert, in 2 ml 2xYT-Carb-20 %Gly aufgenommen und bei -80 °C als angereicherte Bakterienbibliothek gelagert. Von den gepickten Klonen wurden Plasmid-Minipräparationen angefertigt und die gewonnenen Plasmide sequenziert.

3.2.5 Produktion von Phagenbibliotheken

50 µl der Bakterienbibliotheken wurden für die weitere Produktion von Phagenbibliotheken in 20 ml 2xYT-Carb-20 %Glu bis zu einer optischen Dichte von OD=0,5 bei 37 °C und 250 rpm kultiviert. Nach Superinfektion von 5 ml dieser Kulturen mit jeweils 25 µl M13K07-Helferphagen und Inkubation für 30 Minuten bei 37 °C und 150 rpm wurden die Kulturen zehn Minuten bei 4.600 rpm zentrifugiert und mit 5 ml 2xYT-Carb gewaschen. Zur Selektion der mit Phagemid und Helferphagen doppelt transfizierten Bakterien erfolgte anschließend die Aufnahme in 50 ml 2xYT-Carb mit Kanamycin. Nach 16 Stunden bei 30 °C und 220 rpm wurden die superinfizierten Bakterien zur Präzipitation für zehn Minuten bei 4.600 rpm zentrifugiert und der Phagen enthaltende Überstand in 10 ml vorgekühlten PEG/NaCl-Puffer gegeben und für zwei Stunden auf Eis inkubiert. Die präzipitierten Phagen wurden für zehn Minuten bei 4.600 rpm pelletiert, und der Überstand wurde verworfen. Nach Resuspension des Phagen-Pellets in 1 ml PBS folgte die Überführung in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß, in das 250 µl PEG/NaCl vorgelegt worden waren. Für 30 Minuten folgte eine zweite Präzipitation auf Eis, nach der die Phagen durch Zentrifugation für fünf Minuten bei 13.000 rpm pelletiert und erneut in 1 ml PBS aufgenommen und in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt wurden. Um noch verbliebene Zelltrümmer und unlösliche Phagen zu entfernen, wurde dieser Schritt wiederholt, bis makroskopisch keine Verunreinigungen mehr sichtbar waren und die gereinigten Phagen bei 4 °C als Phagenbibliothek gelagert werden konnten.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Periplasmatische Expression in *E.coli*

E.coli-Expressionssysteme dienen der Proteinsynthese nach Transformation mit der kodierenden DNA des Proteins in entsprechenden Vektoren. Der periplasmatische Raum der bakteriellen Zellwand bietet ein nicht reduzierendes Milieu, das die Faltung der gebildeten Proteine, die über interne Disulfidbrücken verfügen, begünstigt. Der verwendete Phagemid-Vektor pHEN2 verfügt über eine pelB-Leadersequenz, die das rekombinante Protein in diesen Raum dirigiert. Für die Expression der VHHs in *E.coli* HB2151 wurden 5 ml 2xYT-Carb-Medium mit einer einzelnen Kolonie von zuvor transformierten Bakterien (**3.1.9**) beimpft und bei 37 °C und 240 rpm bis zum Erreichen einer optischen Dichte von OD=0,5 kultiviert. Zur Induktion der Proteinexpression wurden 5 µl des Lactose-Analogons IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) in einer Konzentration von 1 mM zugegeben. Nach vier Stunden wurden die Bakterien durch zehn Minuten Zentrifugation bei 4.000 rpm pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 500 µl PBS aufgenommen. Der Schritt der Zentrifugation wurde wiederholt, und das Pellet kurze Zeit getrocknet, bevor es in 200 µl

Lysepuffer resuspendiert und eine Stunde auf Eis lysiert wurde. Anschließend wurden die sphäroblastierten Bakterien bei 14.000 rpm und 4 °C für zehn Minuten zentrifugiert und der Überstand mit den darin enthaltenen Proteinen steril filtriert, um bakterielle Kontaminationen zu verhindern. Die Expressionsrate wurde mittels SDS-PAGE überprüft.

3.3.2 Aufreinigung von Periplasmalysaten

Die Aufreinigung von VHHs, die mit einem c-Myc-6xHIS-*tag* markiert sind, beruht auf der Chelatbildung von Histidin mit Nickel-Ionen. 200 µl Periplasmalysat wurden mit 50 µl Ni²⁺-Ionen, die in einem stabilen Komplex mit NTA (Nitriloessigsäure) verbunden sind, für eine Stunde auf dem Rollbrett inkubiert, drei Waschschritten mit PBS+/- unterzogen, und der abgenommene Überstand wurde zur Kontrolle verwahrt. Die Elution der markierten Proteine erfolgte mit einem Imidazol-Elutionpuffer (250 mM). Zur Umpufferung der Imidazol-Euate wurden Spin columns der Firma Thermo Fisher Scientific verwendet, die zuvor durch PBS+/- mit 0,5 % BSA äquilibriert worden waren. Nach Zentrifugation für zwei Minuten bei 4.000 rpm wurde der Durchfluss, der die umgepufferten Proteine enthielt, gesammelt und die Säulen wurden mit Waschpuffer gewaschen.

3.3.3 Quantifizierung von Proteinen

Zur Quantifizierung von Proteinen wurde am Spektrophotometer mit dem BCA-Protein Assay Reagent von Pierce gemäß den Herstellerangaben die Proteinkonzentration kalorimetrisch im Vergleich zu einer parallel angesetzten BSA-Verdünnungsreihe mit bekannter Konzentration festgestellt.

3.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wird zur Analyse von Proteinen verwendet. Diese werden anhand ihres Wanderungsverhaltens im elektrischen Feld größenfraktioniert. Durch das zugesetzte Natriumlaurylsulfat (sodium dodecyl sulphate, SDS), ein anionisches Tensid, das sich gleichmäßig an Proteine anlagert, werden diese zunächst denaturiert und wandern aufgrund der starken negativen Ladung des SDS analog zu ihrem Molekulargewicht in einem elektrischen Feld, das an ein Polyacrylamidgel gelegt wird, in dessen Taschen die Proteine zuvor pipettiert wurden. Verwendet wurde das Xcell-II-MiniCell-System mit NuPAGE-Novex-Gelen und Puffern von Invitrogen mit 12 %igen Polyacrylamidgelen, die zehn oder zwölf Taschen für den Probenauftrag besitzen. Für die reduzierende SDS-PAGE wurden die 10 µl-Proben mit 10 µl ddH₂O, NuPAGE-4xLDS-Probenpuffer und NuPAGE 10xsample reducing agent von Invitrogen im Verhältnis (5:5:1) versetzt und zehn Minuten bei 70 °C inkubiert. Die

Gele wurden nach Angaben des Herstellers vorbereitet und mit MES-Puffer bei einer Spannung von 200 V für 45 Minuten der Elektrophorese unterzogen.

3.3.5 Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung von SDS-PAGE-Gelen

Die Coomassie-Färbung dient der Visualisierung der Proteinbanden in SDS-Gelen. Nach abgeschlossener elektrophoretischer Auftrennung wurden die Proteinbanden mit dem Novex colloidal blue staining Kit von Invitrogen unter Einhaltung der Herstellerangaben über Nacht angefärbt. Die Entfärbung wurde für sechs bis acht Stunden mit einem Aktivkohlebeutel in de-ionisiertem Wasser bis zur gewünschten Farbintensität vorgenommen. Für die Konservierung des Gels wurde es fünf Minuten in Gel-Dry-Drying-Solution von Invitrogen geschwenkt und anschließend zwischen zwei Blättern Cellophanfolie in einen Rahmen eingespannt, getrocknet und anschließend zur Dokumentation eingescannt.

3.3.6 Fluorochromkonjugation an Antikörpern

Zur Konjugation von Alexa-647 und Alexa-680 mit Antikörpern oder VHHs wurden das Alexa Fluor-647 Protein Labeling Kit bzw. Alexa Fluor-680 Protein Labeling Kit von Molecular Probes nach Herstellerangaben verwendet und die erfolgreiche Kopplung durchflusszytometrisch analysiert.

3.4 Zellbiologische Methoden

3.4.1 Kultivieren und Passagieren von Zellen

Die verwendeten Zelllinien wurden in ihrem jeweiligen Zellkulturmedium im Brutschrank bei 37 °C und unter 5 %iger CO₂-Atmosphäre kultiviert, Zentrifugationen erfolgten bei allen Zellen für fünf Minuten bei 1.600 rpm und 4 °C. Sämtliche Zellkulturarbeiten wurden unter einer sterilen Laminarströmungsbank durchgeführt. In der Zellkultur eingesetzte Materialien und Medien wurden zuvor entweder für 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert oder mittels Steriflip oder Stericup steril filtriert. Die Suspensionszellen wurden in RPMI-Medium mit 10 % FCS, 1 % Natriumpyruvat und 1 % L-Glutamin in 10 cm-Zellkulturschalen kultiviert. Zur Passagierung dieser Zellen wurde in festen zeitlichen Abständen ein Aliquot der Zellsuspension mit frischem Medium in einer neuen Kulturschale 1:2 bis 1:40 verdünnt, abhängig vom Bedarf und dem Zustand der Zellen. HEK293-6E-Zellen wurden in FreeStyle-F17-Medium mit 2 % L-Glutamin, 1 % Pluronic, 0,05 % Genticin und 1% FCS in Zellkulturflaschen kultiviert. Für das Passagieren wurden HEK293-6E -ellen mit PBS gewaschen, anschließend mit 1-2 ml 1xTrypsin abgelöst, in frischem Medium gewaschen und je nach Bedarf und Zustand der Zellen in Verdünnungen von 1:2 bis 1:10 geteilt.

3.4.2 Zellzahlbestimmung mit der Neubauer-Zählkammer

Die Zellzahl in Suspension wurde durch eine Neubauer-Zählkammer (Neubauer improved LaborOptik) ermittelt.

3.4.3 Transfektion und transiente Expression in HEK293-6E-Zellen

Die Transfektion von HEK293-6E-Zellen, einer humanen, embryonalen Nierenzelllinie, dient der vorübergehenden Synthese rekombinanter Proteine. Vor der Transfektion wurde das Medium komplett abgesaugt, und die Zellen wurden mit Transfektionsmedium bestehend aus FreeStyle-F17-Medium mit 2 % L-Glutamin und 1 % Pluronic gewaschen. Verwendet wurde der Expressionsvektor pCSE2.5, der mithilfe des Transfektionsreagenz jetPEI von Polyplus transfection entsprechend der Empfehlung des Herstellers in die Zellen eingebracht wurde. JetPEI ist ein kationisches, polymeres Polyethylenimin, welches durch Komplexierung mit der DNA die endozytotische Aufnahme in das Zytosol und in den Zellkern bewirkt. DNA und JetPEI wurden zunächst separat in Transfektionsmedium gelöst, anschließend JetPEI auf die DNA transferiert und nach 30 Minuten Inkubation auf die Zellen gegeben. Nach 24 Stunden bei 37 °C erfolgte die Zugabe von 2,5 % Feedingmedium, F17 mit 20 % (wt/vol) Tryptone, zum Medium der Zellen. Die Zellüberstände wurden nach 5 weiteren Tagen bei 37 °C abgenommen, zentrifugiert und steril filtriert.

3.4.4 Aufreinigung von HEK293-6E-Zellüberständen mittels Ni-NTA-Säulen

Die Überstände von HEK293-6E-Zellen, die transient VHHs mit c-Myc-6HIS-tag exprimierten, konnten aufgrund der Histidin-Markierung und der spezifischen Bindung von Histidin an Nickel-Ionen mithilfe von Ni-NTA aufgereinigt werden. Verwendet wurden Säulen der Firma Qiagen, die mit 2 ml Ni-NTA befüllt und mit 10 ml PBS-/- gewaschen wurden. Bis zu 30 ml der HEK293-6E-Zellüberstände konnten aufgereinigt werden, bevor die Säulen erneut mit 10 ml PBS-/- gewaschen wurden. Die Elution erfolgte mit Elutionspuffer (250 mM Imidazol) in drei Fraktionen zu 1,25 ml. Durchfluss und Waschungsrückstände wurden bis nach einer Kontrolle mittels SDS-PAGE aufbewahrt. Zur Lagerung wurden die Säulen mit 2-3 ml 20 %igem, vergälltem Ethanol befüllt, verschlossen und bei 4 °C verwahrt, vor jeder weiteren Verwendung wurden sie mit 10 ml Elutionspuffer gespült. Die Eluate wurden mittels PD-10-Säulen umgepuffert, dabei wurden 2,5 ml der Eluate in PBS-/- mit 3,5 ml PBS+/- eluiert. Die weitere Einstellung der Konzentration erfolgte in Amicon-Säulen durch Zentrifugation bei 4.600 rpm.

3.4.5 Aufreinigung von HEK293-6E-Zellüberständen mittels Protein-G-Säule

Die Überstände von HEK293-6E-Zellen, die transient VHHs mit einem humanen IgG1 Fc-tag exprimierten, konnten mithilfe von Protein G aufgereinigt werden, weil Protein G, ein in der Zellwand von Streptococccen vorkommendes Protein, Bindungsdomänen besitzt, die eine hohe Affinität für die Fc-Region von Immunglobulinen des Isotyps G besitzen. Verwendet wurden Säulen der Firma Quiagen. Diese wurden mit 2 ml Protein G befüllt und mit 10 ml PBS-/- gewaschen. Nach Befüllung mit bis zu 30 ml der Zellüberstände wurden die Säulen mit 10 ml PBS-/- gewaschen. Elution erfolgte mit Elutionspuffer (0,1 M Glycin-HCl), der auf einen pH-Wert von 2,7 eingestellt wurde, in drei Fraktionen zu 1,25 ml. Zur Neutralisation wurde in die Auffanggefäße ein Neutralisationspuffer (1 M Tris HCl) mit einem pH von 9 im Verhältnis von 100 µl/1 ml vorgelegt. Durchfluss und Waschungsrückstände wurden bis nach einer Kontrolle mittels SDS-PAGE aufbewahrt. Zur Lagerung wurden die Säulen mit 2-3 ml 20 %igem, vergälltem Ethanol befüllt, verschlossen und bei 4 °C verwahrt, vor jeder weiteren Verwendung wurden sie mit 10 ml Elutionspuffer gespült. Die Eluate wurden mittels PD-10-Säulen umgepuffert, dabei wurden 2,5 ml der Eluate in nPBS-/- mit 3,5 ml PBS+/+ eluiert. Wurde eine weitere Konzentration benötigt, erfolgte diese in Amicon-Säulen durch Zentrifugation bei 4.600 rpm.

3.5 Immunologische Methoden

3.5.1 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie (fluorescence-activated cell sorting, FACS) wird im Rahmen der Charakterisierung von Zellen zur quantitativen Bestimmung der Expression von Oberflächenproteinen eingesetzt, indem fluorochromkonjugierte Antikörper oder VHHs definierte Antigene auf der Zelloberfläche markieren. Weiterhin kann durchflusszytometrisch das Bindungsverhalten von Antikörpern analysiert werden. Mehrere Tausend Zellen werden dabei pro Sekunde in einem laminaren Flüssigkeitsstrom einzeln durch eine Laseroptik geführt. Durch die Lichtstreuung können die Zellen anhand ihrer Dimension (Forward scatter, FCS) und ihrer Granulierung (Sideward scatter, SSC) kategorisiert werden. Sind die Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert, bewirkt der Laser eine Anregung der Fluorochrome, die in der Folge Licht einer bestimmten Wellenlänge emittieren. Alexa Fluor 680 (AF680), Fluorescein Isothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Allophycocyanin (APC) und Propidiumiodid (PI) wurden als Fluoreszenzfarbstoffe verwendet.

Pro Färbung wurden $0,5 \times 10^6$ oder 1×10^6 Zellen mit definierten Mengen eines fluorochromkonjugierten Antikörpers oder VHHs für 30 Minuten inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS und Zentrifugation (5 Minuten, 1.600 rpm) wurden die Zellen in 200 µl

PBS resuspendiert und konnten durchflusszytometrisch analysiert werden. Bei einem unkonjugierten Primärantikörper oder -VHH erfolgte eine weitere Inkubation mit einem fluorochromkonjugierten Zweitantikörper mit Spezifität für den *tag* des ersten Antikörpers, und die Zellen wurden auf dieselbe Weise inkubiert und gewaschen. Die Analyse erfolgte am FACS Canto (BD Biosciences). Die Auswertung wurde mithilfe der FlowJo-Software durchgeführt.

3.5.2 Spezifitäts-Assay

Zur Überprüfung und Visualisierung der Spezifität von VHHs zu ihrem Zielprotein wurden jeweils $0,5 \times 10^6$ Zellen, die das Zielprotein nicht exprimieren, und $0,5 \times 10^6$ stabil mit dem Zielantigen transfizierte Zellen der gleichen Zelllinie mit 50-200 ng VHHs für 30 Minuten inkubiert und anschließend drei Waschschritten mit PBS unterzogen. Zur Detektion wurden 150-300 ng eines fluorochromgekoppelten Antikörpers, der gegen den c-Myc-6HIS tag gerichtet ist, verwendet.

3.5.3 Affinitäts-Assay

Zur Analyse der konzentrationsabhängigen Affinität wurden 1×10^6 das Zielantigen hoch exprimierende Zellen mit VHHs in Konzentrationen von 0,3 μM bis 0,3 nM inkubiert. Die Ausgangskonzentration wurde in sechs Schritten fortlaufend um den Faktor $1:\sqrt{10}$ mit PBS mit 0,2 % BSA verdünnt. Die Detektion erfolgte durch 100 ng eines gegen den c-Myc-6HIS tag gerichteten Antikörper.

3.5.4 Enzyminhibitions-Assay

Zur Analyse der Wirkung von VHHs auf die NAD-Glykohydrolasefunktion ihres Zielantigens wurden 1×10^6 Zellen, die ART2.2 und hCD38 exprimieren, und als Vergleich 1×10^6 Zellen der gleichen Zelllinie, die nur ART2.2 exprimieren, in getrennten Ansätzen mit jeweils 5 μg VHHs für 20 Minuten inkubiert und anschließend 1 μM e-NAD zugegeben. Die Detektion erfolgte durch 0,67 μg eines Antikörpers, dessen Epitop die etheno-Adenosin-Gruppe ist.

3.5.5 Kreuzblockade-Assays

Kreuzblockade-Assays dienen der relativen Epitopkartierung des Zielproteins. 1×10^6 das Zielprotein exprimierende Zellen wurden jeweils mit 1-2 μg unkonjugierten VHHs für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Als Sekundärantikörper wurden 0,1 μg einer ebenfalls für das Zielantigen spezifischen, fluorochromkonjugierten VHH hinzugefügt, deren Bindung je nach Epitop der vorangegangenen VHH-Bindung blockiert wurde.

3.5.6 CDC-Assays

CDC-Assays dienen der Feststellung der CDC-induzierten Zytotoxizitätsrate. 1×10^6 Zellen unterschiedlicher Zelllinien wurden mit variierenden Mengen von VHHs für zehn Minuten inkubiert. Es folgte eine Inkubation mit humanem Serum unterschiedlicher Quantität für eine Stunde bei 37 °C. Zur Detektion der Apoptose wurden die Zellen mit einem Antikörper gegen Annexin V für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Zur Detektion nekrotischer Zellen erfolgte unmittelbar vor der Analyse am Durchflusszytometer die Zugabe von Propidiumiodid.

4 Ergebnisse

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Generierung und Charakterisierung human CD38-spezifischer VHHs und ihre Überführung in ein VHH-Fc-Format dargestellt. Durch die verstärkende Wirkung von CD38 im Rahmen der Pathogenese von B-Zellerkrankungen wie dem MM und der CLL und durch seine hohe Expression in ihrem Verlauf fungiert es als Zielantigen in der antikörperbasierten Immuntherapie. In klinischen Studien konnte der monoklonale Antikörper Daratumumab vor allem durch sein Potenzial zur Auslösung der komplementabhängigen Zytolyse (CDC) überzeugen. Die Zielsetzung dieser Arbeit besteht deshalb in der Selektion und Charakterisierung von VHHs und ihrer Produktion als Fc-Fusionsprotein, um sie bezüglich ihres Potenzials zur Induktion von CDC zu analysieren.

Im ersten Teil der Ergebnisse wird die Selektion, Sequenzierung, Produktion und Affinitätsreinigung CD38-spezifischer VHHs gezeigt. Nach vorausgegangener Immunisierung von vier Lamas **(1.3.1)** erfolgt zunächst die Selektion von VHHs aus den Phagenbibliotheken der Lamas 538 und 539 **(4.1.1)** sowie ihre Expression in *E.coli* **(4.1.2)**. Anschließend wird die Spezifität dieser VHH-Familien sowie der zuvor selektierten Familien aus den Lamas 10 und 25 (Unger, 2012) demonstriert **(4.1.3)** und die Umklonierung in einen Vektor beschrieben, der die Fusion mit Fc-Anteilen sowie die optimierte Expression durch HEK293-6E-Zellen und anschließende Affinitätsreinigung **(4.1.4)** erlaubt.

Im zweiten Teil wird die Stabilität der Bindung von VHHs und Zielantigen im interfamiliären Vergleich analysiert **(4.2.1)** und eine relative Epitopkartierung des Zielantigens hCD38 vorgenommen **(4.2.2)**.

Im dritten Teil folgt eine vergleichende Analyse von Daratumumab **(4.3.1)** und CD38-spezifischen VHHs bezüglich ihrer Epitope und ihrer Zytotoxizität **(4.3.2, 4.3.3)**.

4.1 Selektion, Sequenzierung, Produktion und Affinitätsreinigung human CD38-spezifischer VHHs

4.1.1 Selektion der Phagenbibliotheken der Lamas 538 und 539

Im Vorfeld wurden aus peripheren Blutlymphozyten der immunisierten Lamas 538 und 539 Phagenbibliotheken erstellt **(1.3.1)**. Verwendet wurden Blutlymphozyten vom Tag 71 des Immunisierungsplanes **(Abb.1.12)**, die nach viermaliger Verabreichung von cDNA mittels Genpistole und einmaliger Proteininjektion gewonnen wurden. Die Phagenbibliotheken wurden im Rahmen dieser Arbeit an der Oberfläche einer CD38-positiven Lymphomzelllinie selektiert, um durch die Koexistenz des Genotyps im Phagemid und der externen

Expression des Phänotyps die DNA CD38-spezifischer VHHs zu isolieren. Um unspezifische Bindungen zu minimieren, wurde die Phagenbibliothek zunächst eine Stunde mit 1 %igem Milchpulver vorinkubiert. Es folgte eine Negativselektion mit der humanen Myelomzelllinie U266, die in nur geringem Maße hCD38 exprimiert, um VHHs, die an andere Oberflächenproteine binden, durch diese Präabsorption zu entfernen. Anschließend wurde eine Selektionsrunde mit der CD38-positiven, humanen Lymphomzelllinie CA46 durchgeführt.

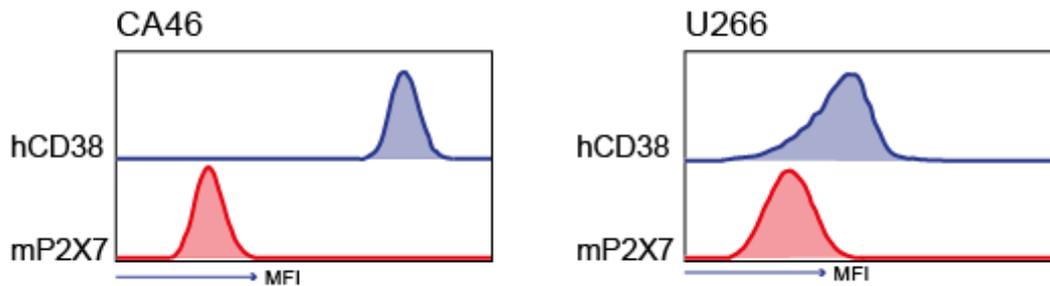


Abb. 4.1: Expression von CD38 auf humanen CA46- und U266-Zellen. Jeweils in Blau ist das Vorkommen von humanem CD38 und als Vergleich in Rot das Vorkommen von murinem P2X7 gezeigt. Auf der Abszisse ist die MFI abgetragen. 1×10^6 Zellen jeder Linie wurden mit $1 \mu\text{g}$ einer Fluoreszenz-markierten VHH inkubiert und im Anschluss durchflusszytometrisch analysiert.

Nach Elution der zellgebundenen Phagen mittels Trypsin wurden *E.coli* des TG1-Stamms mit ihnen infiziert. Nach der Ausplattierung wurden von jeder Positivselektion 24 Klone und zu Vergleichs- und Kontrollzwecken von den Negativselektionen jeweils 12 Klone gepickt. Insgesamt erwiesen sich 34 (47,2 %) der Sequenzen als intakt, wobei ein Klon dreifach und drei Klone als identische Isolate zweifach gefunden wurden. Von den intakten Sequenzen trugen alle das kanonische und nur eines ein zusätzliches Cysteinpaar (u+19). Die CDR3-Längen variierten von 19 bis 7 Aminosäuren, mit einem Mittelwert von 11 und dem Median bei 9,5 Aminosäuren. Es zeigten sich ebenfalls die für VHHs typischen hydrophilen Aminosäuresubstitutionen. Auffällig sind die insgesamt kurzen, mehrheitlich im einstelligen Bereich liegenden CDR3-Domänen.

A Phagenbibliothek 538

Selektion an U266

L-14 (JK44) LSCAASGRDTRYTMGWFRQAPGKEREFVSGITWNGG---TSYAxxxTAVVYCAADRFTLVPTTSDLDY
 L-12 (JK45) LSCAASGSISINAMAWYRQAPGKERKLVAHIGVDGS---TVYDxxxTAVVYCNAEYRWRQSDRDDY
 L-12.1 (JK46) LSCAASGRTFSSVAMGWFRQAPGKEREFVATINWSGGR---TTYAxxxTAVVYCAADRFSVVAVEYDY
 L-9 (JK41) LSCAVSGRSLMNDMAWYRQAPGKERELVAGVSSSGN---TNYAxxxTAVVYCNNAVQRIMKRRY
 L-9.1b (JK42) LSCVASERIFSRNTMGWYRQAPGKQRELVAYITSLGI---ANYAxxxTAVVYCNVWHYAAGRDY
 L-9.1c (JK49) LSCVASERIFSRNTMGWYRQAPGKQRELVARIASLGI---TNYAxxxTAVVYCNVWHYAAGRDY
 L-8.g (JK43) LSCAASGVVFSIYDMGWYRQAPGKQRELVAAITSVTSGGSTNYAxxxTAVVYCNADHTFAGNY
 L-8.h (JK54) LSCGATGIFSIINDMGWYRQAPGKQRELVAEITRGGG---TNYAxxxTAVVYCNAAHTFSGSF
 L-7 (JK47) LSCAASEIFFRLLTMGWYRQAPGKQRELVAEISSRGN---TKYAxxxTAVVYCNTSPPEAY

Selektion an CA46

L-9.1a (JK2) LSCVGSERIFSRNTMGWYRQAPGKQRELVGVGSMGI---TNYAxxxTAVVYCNVWHYAAGRDY
 L-9.1c (JK12) LSCVASERIFSRNTMGWYRQAPGKQRELVARIASLGI---TNYAxxxTAVVYCNVWHYAAGRDY
 L-9.1c (JK14) LSCVASERIFSRNTMGWYRQAPGKQRELVARIASLGI---TNYAxxxTAVVYCNVWHYAAGRDY

B Phagenbibliothek 539

Selektion an U266

u+19 (JK71) LSCATAGFTLDHYPIVWFRQAPGKAHEGVACLDDNDGS--AHYVxxxTAVVYCAADLGRAETCLRFREERNFGS
 u-16 (JK58) LSCAAESEYFIIHYGMGWFRQPPGKEREFVAAISWNGDS---TNYAxxxTAAVYCAAHLPGPWRPTISTEYAY
 L-15 (JK74) LSCTTSEIFSSAMGWYRQALGKQRELVATITGGT---TNYAxxxTAIYYCAADRWWLVQLRIATPAY
 u+/-13 (JK66) LSCAASGTTSSIGAMGWFRQGGPKQREWWAGISSDGI---TAYExxxTAVVYCAAHLSRDRERGRGT
 L-8f (JK73) LSCAASGRTFNINAMGWYRQAPGKQRELVAEATSRGS---TNYAxxxTAVVYCNAEHTFMGAY
 L-7.1 (JK60) LSCSASPDIFKLNTMAWYRQAPGKQRELVAAAMGISGR---TNIVxxxTAVVYFCRADGPNVVI

Selektion an CA46

L-15.4 (JK19) LSCAASGRTFVSVFMGWFRQAPGKEREFVAAINWRGST--TAYAxxxTAIYYCAEGRTASASTMIREYDS
 L-14.1a (JK22) LSCAASGRTLSNYAMAWFRQGGPKEREFVASISASDS---TLYAxxxTTVYYCAARFWIGVRAPAEYNY
 L-14.1a (JK33) LSCAASGRTLSNYAMAWFRQGGPKEREFVASISASDS---TLYAxxxTTVYYCAARFWIGVRAPAEYNY
 L-14.1b (JK34) LSCAASGRTFSNYAMAWFRQGGPKEREFVAAISAADS---TLYAxxxTAVVYCAARWWIAVRAPAEYNY
 L-14.1b (JK35) LSCAASGRTFSNYAMAWFRQGGPKEREFVAAISAADS---TLYAxxxTAVVYCAARWWIAVRAPAEYNY
 L-13a (JK28) LSCAISGRTFIADMG-WFRQAPGKEREFQAGITWFGGS---TYYAxxxTAIYYCAAGLKRIGDQREADY
 L-13a (JK20) LSCAISGRTFIADMG-WFRQAPGKEREFQAGITWFGGS---TYYAxxxTAIYYCAAGLKRIGDQREADY
 L-13b (JK26) LSCAISGRTFINDMG-WFRQAPGKEREFQAGITWFGGS---TYYAxxxTAIYYCAAGLKRIGDQREADY
 u-13c (JK27) LSCAISGRTFIADMG-WFRQAPGKEREFQAGITWFGGS---TYYAxxxTAIYYCAAGLKRIGDQREADY
 L-9.2a (JK29) LSCVASGSISNIITMGWYRQAPGKQRELVARIISIGGS---TGYSxxxTAVVYCNAGNPGTRYIY
 L-9.2b (JK25) LSCVASGSISSIITMGWYRQAPGKQRELVARVIIGGS---TGYAxxxTAVVYCNAGNPGTSYHY
 L-8a (JK36) LSCAASGIILRIYDMGWYRQAPGKQRELVAAITSRGS---TNYAxxxTAVVYCNADHTFAGVY
 L-8b (JK24) LSCAASGIILRIYDMGWYRQAPGKQRELVAEITSGGS---TNYAxxxTAVVYCNAAHTFAGAY
 L-8c (JK30) LSCAASGIILRIYDMGWYRQAPGKQRELVAAITSGGR---TNYAxxxTAVVYCNADHTFAGVY
 L-8d (JK32) LSCAASGSTLRLYDMGWYRQADGKQRELVAEITSGGS---TNYAxxxTAVVYCNAEHTFMGAY
 L-8e (JK31) LSCAASGIILRLYDMGWYRQTPGKQRELVAEITSGGS---TNYAxxxTAVVYCNADHTFAGVY

Abb. 4.2: Aminosäuresequenzen der intakten Klone aus den VHH-Bibliotheken der mit CD38 immunisierten Lamas 538 und 539. Die VHHs sind nach der Länge der CDR3-Regionen sortiert, die 7 bis 19 Aminosäuren beträgt. Die drei CDR-Regionen (CDR1: rot, CDR2: grün und CDR3: blau) sowie die für VHHs typischen hydrophilen Aminosäuresubstitutionen (magenta) in der FR2 sind farbig hervorgehoben. Gelb hinterlegt sind die kanonischen Cysteinpaare in FR1 und FR3 sowie optionale in CDR2 und CDR3. Die Sequenzen sind verkürzt dargestellt, die vollständigen Sequenzen befinden sich im Anhang. Die Namensgebung der Sequenzen reflektiert das Vorkommen einer kurzen, langen oder unbekanntenen *hinge*-Region (*short hinge*, *long hinge*, *unknown hinge*, *s/l/u*). Bei den VHHs mit unbekannter *hinge* wurde anstatt des Restriktionsenzym NotI, welches innerhalb der *hinge*-Region schneidet und sie dadurch identifizierbar belässt, mit dem Restriktionsenzym BstII geschnitten, welches die *hinge*-Region vollständig abtrennt. Das Vorkommen eines optionalen Cysteinpaares wird als fehlend (-) oder vorhanden (+) angegeben. Die erste Ziffer zeigt die Anzahl der Aminosäuren in der CDR3, die nächste Ziffer benennt die unterschiedlichen Familien, die einzelnen Familienmitglieder werden durch den letzten Buchstaben differenziert. In Klammern ist die Nummer des Klones vermerkt.

Bei den Klonen aus Lama 538 erwiesen sich insgesamt 12 (33 %) als lesbar, davon gehörten neun Klone der Negativselektion an, die sich insgesamt sieben Familien zuordnen ließen. Die drei Klone der Selektion mit der hCD38 stark exprimierenden Zelllinie CA46 gehörten einer einzigen Familie an. Bei Lama 539 lag der Anteil bei 22 (61 %). Zur Negativselektion gehörten sechs Klone, die keine Familienähnlichkeiten aufwiesen und sich entsprechend sechs Familien zuordnen ließen, die Anzahl der intakten Klone der Positivselektion lag bei 16, die sich in fünf Familien aufgliederten. Die VHH-Familien L-9.1 aus Lama 538 und L-8 aus Lama 539 konnten bereits in der primären Bakterienbibliothek detektiert werden. Identische Isolate weisen L-9.1c und L-12.1 auf.

4.1.2 Expression der VHHs in *E.coli*

Um ihre Spezifität für CD38 zu analysieren, wurden die VHHs rekombinant in *E.coli* exprimiert. Zu diesem Zweck wurde der *E.coli*-Stamm HB2152 verwendet, der VHHs in löslicher Form produziert, da er als non-supressor-Bakterienstamm, das Amber-Stopcodon zwischen VHH und Phagenkapsidprotein im Phagemidvektor pHEN2 erkennt. Durch den ebenfalls zum Vektor gehörenden *pelB*-Leader werden die VHHs in den periplasmatischen Raum transportiert, in dessen reduzierenden Bedingungen sich Disulfidbrücken ausbilden können. Die VHH-DNA wurde durch Hitzeschock in die Bakterien eingebracht, und nach einstündiger Inkubation bei 37 °C und 240 rpm ein Ausstrich auf Carbenicillin-Agarplatten vorgenommen, um durch Prüfung der gleichzeitig übertragenen Antibiotikaresistenz die über Nacht wachsenden, erfolgreich transformierten *E.coli* zu isolieren. Nach Beimpfung mit einzelnen Kolonien transformierter Zellen wurden 5 ml Kulturen auf 2YT-Basis mit Carbenicillin bis zu einer optischen Dichte (OD) von 0,5 wachsen gelassen und die Expression durch die Zugabe von IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) induziert, welches von den Bakterien nicht metabolisiert wird und daher dauerhaft eine Aktivierung des *lac*-Operons der Bakterien bewirkt. Nach einer dreistündigen Inkubationszeit wurden die

Bakterien geerntet und durch Zugabe von Lysepuffer Periplasmalysate erstellt. Aus 5 ml *E.coli*-Kulturen konnten 200 µl Lysat gewonnen werden. Mittels SDS-PAGE erfolgte die größenfraktionierte Darstellung von 10 µl der Lysate. Die Ergebnisse (**Abb.4.3**) zeigen auf Höhe von 14-20 kDa zwei deutliche Banden, wobei die obere dem erwarteten Molekulargewicht der VHHs inklusive eines C-terminalen tags, der aus einem Peptid des c-Myc-Onkogens und einem Hexa-Histidin (6xHIS) besteht, entspricht. Die Bande mit geringerem Molekulargewicht entspricht am ehesten den VHHs, deren tag proteolytisch abgespalten wurde. Im Vergleich zu dem aufgetragenen Marker lässt sich die Ausbeute der VHHs abschätzen. Die VHHs L-9.1a, L-15.4, L-14.1a, L-8b, L-9.2b und L-13b weisen eine Proteinmenge von ca. 5 µg/10 µl auf, dies entspricht einem Gesamtertrag von 100 µg/5 ml *E.coli*-Kultur. Die VHHs L-9.2a, L-8e und L-8d zeigen eine Proteinmenge von ca. 0,5-1 µg/10 µl, entsprechend einem Gesamtertrag von 10-20 µg/5 ml *E.coli*-Kultur. Die variierenden Expressionsmengen erwiesen sich im weiteren Verlauf als nicht sequenzabhängig. Die durchschnittliche Produktionsrate des *E.coli*-Expressionssystems entsprach ca.50 µg/5 ml *E.coli*-Kultur, bzw. 10 µg/ml Kultur.

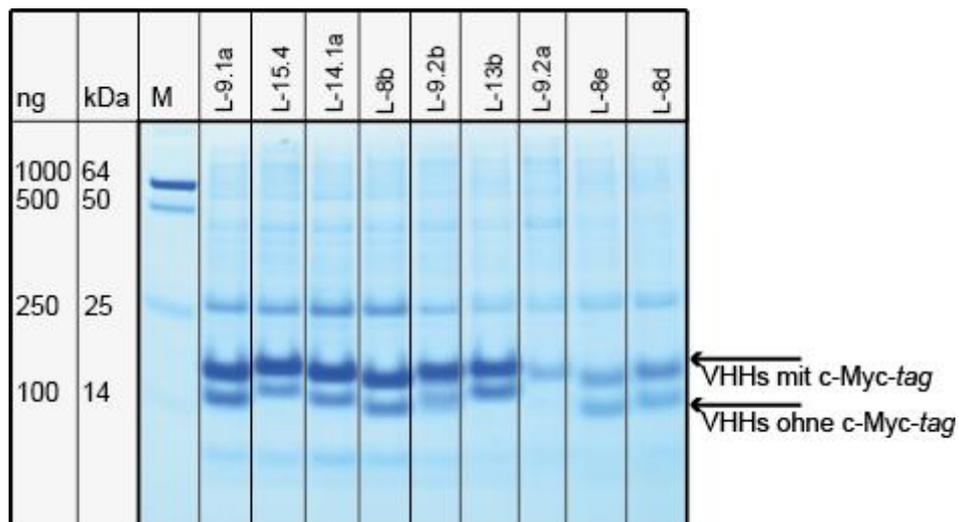


Abb. 4.3: SDS-Page-Darstellung der Periplasmalysate nach Transformation von *E.coli* mit verschiedenen VHHs. Durch Pfeile markiert sind die Banden, die der Größe nach den VHHs mit und ohne proteolytisch abgespaltenem c-Myc-6xHIS-tag entsprechen. Der Auftrag des Markers (M) erlaubt die quantitative Schätzung der gewonnenen Proteinmengen. Während die VHHs L-9.1a, L-15.4, L-14.1a, L-8b, L-9.2b und L-13b eine Proteinmenge von ca. 5 µg/10 µl aufweisen, zeigen die VHHs L-9.2a, L-8e und L-8d eine Proteinmenge von ca.0,5-1 µg/10 µl. Zur Produktion der VHHs wurde der *E.coli*-Stamm HB2151 verwendet. 33 µl HB2151 wurden auf Eis aufgetaut und mit 1 µl DNA 30 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 30 Sekunden bei 42 °C und anschließend zwei Minuten Inkubation auf Eis. Mit 270 µl Soc-Medium wurden die Proben eine Stunde bei 37 °C und 240 rpm geschüttelt. Nach einem Ausstrich von 50 µl auf einer Carb-Platte wurden am nächsten Tag Klone gepickt, 5 ml 2YT-Medium damit infiziert und bis zu einer OD von 0,5 heranwachsen gelassen. Die Expression der VHHs wurde durch Zugabe von 5 µl IPTG (1 mM) für drei Stunden bei 37 °C induziert. Die Bakterien wurden mittels Zentrifugation geerntet (15 Minuten, 4.000 rpm, 4 °C). Für die Lyse wurde mit 200 µl Lysepuffer für eine Stunde auf Eis inkubiert, für fünf Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand bei 4° C gelagert. 10 µl der Periplasmalysate wurden für die SDS-PAGE auf das Gel aufgetragen.

Die Periplasmalysate wurden im nächsten Schritt mittels Nickel-NTA aufgereinigt. Die Entfernung proteolytisch gespaltener VHHs wurde angestrebt, da der *tag* der Detektion in durchflusszytometrischen Analysen dient und eine fehlende Detektionsmöglichkeit gebundener VHHs zur Verfälschung von Ergebnissen führt. Durch die spezifische Bindung von Histidin an Nickel-Ionen wurde die Ausbildung von Chelatkomplexen induziert, sodass die Proteine mit erhaltenem C-terminalen c-Myc-6xHIS-*tag* isoliert und anschließend durch Imidazol-Puffer eluiert werden konnten. Aus 200 µl Periplasmalysat wurden 120 µl Eluat gewonnen, von denen 10 µl durch SDS-PAGE dargestellt wurden. Es zeigt sich, dass durch die Filterung die Proteinmenge stark gemindert wurde, sodass anhand des Markers die Ausbeute an aufgereinigtem Protein auf ca. 3-5 µg/5 ml *E.coli*-Kultur geschätzt werden kann.

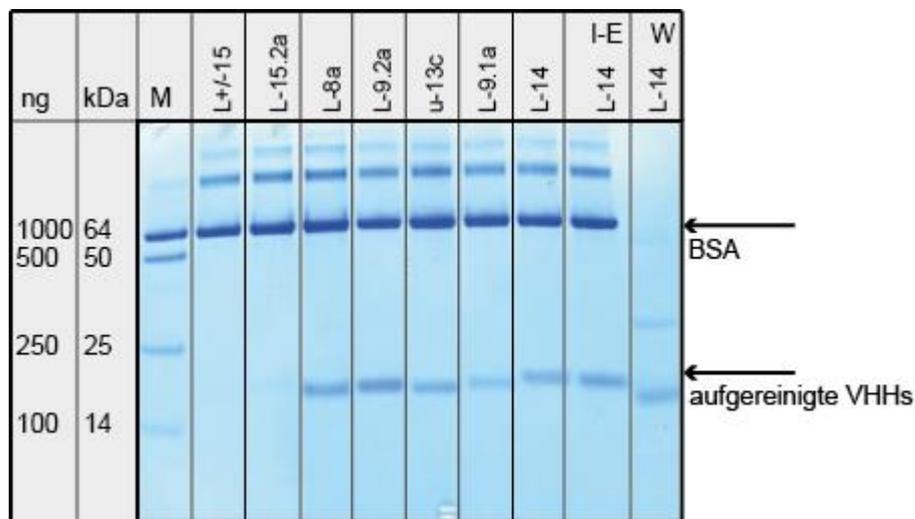


Abb. 4.4: Analyse des Aufreinigungsprozesses der verschiedenen VHHs mittels SDS-Page. Aus 5 ml Kulturvolumen transformierter HB2151 *E.coli* wurden 200 µl Periplasmalysate gewonnen, die über den C-terminalen c-Myc-6xHIS-*tag* mittels Ni-NTA aufgereinigt wurden. Nach Chelatierung mit 50 µl Ni-NTA wurden die Proben gewaschen, mit 250 mM Imidazol-Puffer in drei Fraktionen eluiert (I-E, Imidazol-Eluat) und zentrifugiert. Die Überstände wurden auf 120 µl Eluat gepoolt und über Pierce spin columns gegeben, die zuvor mit PBS+/+ und 0,05 % BSA äquilibriert wurden. Die umgepufferten Eluate wurden durch Zentrifugation für zwei Minuten bei 4.000 rpm freigesetzt. Je 10 µl des umgepufferten Eluats jeder Probe und zusätzlich das Imidazol-Eluat (I-E) und die Waschung (W) eines mit Ni-NTA chelatierten Lysats wurden auf das Gel aufgetragen. Die Proteinmenge kann im Vergleich mit dem Marker (M) je nach Spur auf 25-40 ng/µl geschätzt werden. Die VHHs L+/-15 und L-15.2a entstammen den Lamas 10 bzw. 25.

4.1.3 Spezifität der selektierten VHHs für CD38

Die durch *E.coli* exprimierten und aufgereinigten VHHs der Lamas 538 und 539 sowie die im Vorfeld selektierten VHHs der Lamas 10 und 25 (Unger, 2012) wurden im nächsten Schritt auf ihre Spezifität für humanes sowie murines CD38 überprüft.

4.1.4 VHHs aus Lama 538 und 539

Die Affinität der produzierten VHHs zu humanem CD38 konnte mithilfe des Durchflusszytometers analysiert werden. Zu diesem Zweck wurden hCD38-negative und stabil hCD38-transfizierte, murine DC27.10-Lymphomzellen zu gleichen Teilen verwendet. Die Zellen wurden zunächst mit 50 ng VHHs aus Periplasmalysaten für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und nicht gebundene VHHs entfernt. Zur Detektion erfolgte danach die Inkubation mit 300 ng eines Antikörpers, der spezifisch das c-Myc-Peptid des tags der VHHs erkennt und mit einem Fluorochrom gekoppelt ist. Da sich die DC27.10-Zellen lediglich in dem Merkmal hCD38 unterscheiden, bestätigt eine Bindung an ca. 50 % der Zellen die spezifische Affinität zu hCD38.

In der Analyse der durchflusszytometrischen Daten zeigen sich zwei klar getrennte Zellpopulationen, die sich im Grad ihrer Fluoreszenzintensität unterscheiden (**Abb.4.5B**), im Diagramm stellt sich dies in Form von zwei Peaks auf der Skala der Fluoreszenzintensität dar (**Abb.4.5C**). Die einzelnen Diagramme zeigen den jeweils durch Mitglieder einer Familie gebundenen Anteil an hCD38-positiven Zellen im Vergleich. Zur Einordnung ist jeweils oben der Einsatz einer hochaffin bindenden Kontroll-VHH und unten als negative Kontrollinstanz die ausschließliche Inkubation mit dem Fluorochrom-gekoppelten anti-c-Myc-Antikörper gezeigt. Die Anzahl der Familienmitglieder variiert. Die VHH-Familie L-14 besteht aus einem einzigen, die VHH-Familie L-8 aus fünf Mitgliedern. Cyan unterlegt ist das Familienmitglied, das den stärksten Fluoreszenzanstieg bewirkt und daher im intrafamiliären Vergleich den größten Anteil hCD38-positiver Zellen binden konnte. Selbst geringe Variationen der Aminosäuresequenz sind für die Affinität und Stabilität der Bindung entscheidend, sodass sich innerhalb der gezeigten Familien auch nicht bindende Mitglieder finden, die nicht mit abgebildet sind. Bei den Familien L-8 sowie L-9.1 rekrutieren sich die Mitglieder sowohl aus der Negativ- als auch aus der Positivselektion. Während sich L-8f aus der Negativselektion als nicht hCD38-spezifisch erwies, zeigt bei VHH-Familie L-9.1 der Klon L-9.1a aus der Positivselektion das stärkste Fluoreszenzsignal. L-9.1b aus der Negativselektion zeigt ein geringeres und L-9.1c, identisch in Negativ- und Positivselektion gefunden, unter den Versuchsbedingungen von **Abb. 4.5**. kein Fluoreszenzsignal. Von den 30 selektierten unterschiedlichen, intakten VHHs erwiesen sich 16 (53 %) als Binder. Bezüglich der Phagenbibliothek 538 erwiesen sich die als einzige in der Positivselektion isolierte Familie (L-9.1) sowie eine der sieben der Negativselektion entstammenden Familien (L-14) als hCD38-spezifisch. Die fünf VHH-Familien der Positivselektion aus der Phagenbibliothek 539 erwiesen sich alle als Binder (L-8, L-9.2, L/u-13, L-14.1, L-15.4), in der Negativselektion erwies sich keine Familie als spezifisch.

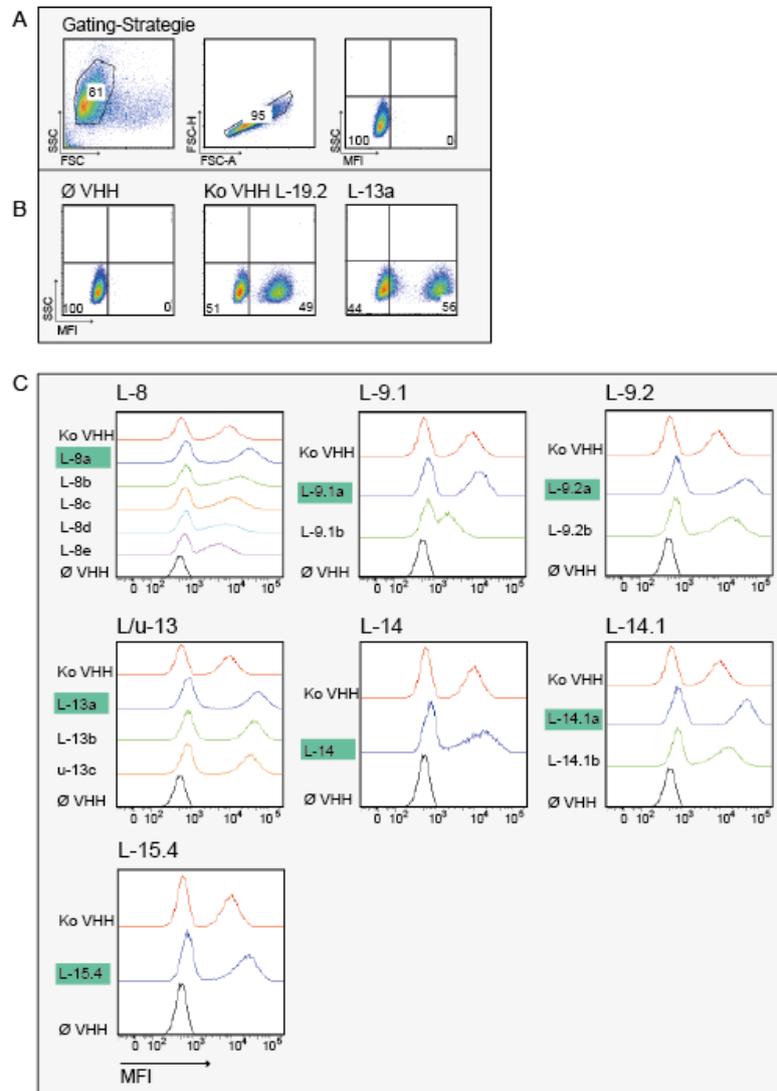


Abb. 4.5: Spezifität der VHH-Familien aus den Lamas 538 und 539. Jeweils $0,5 \times 10^6$ murine, untransfizierte und $0,5 \times 10^6$ hCD38-transfizierte DC27.10-Zellen wurden mit 50-200 ng VHHs aus Periplasmalysaten für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und drei Waschschrinen unterzogen. Zur Detektion wurden die Zellen anschließend mit 300 ng eines mit dem Fluorochrom FITC gekoppelten c-Myc-Antikörpers weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und zweimal gewaschen. Im Anschluss wurde die Anfärbung durchflusszytometrisch analysiert. **(A) Gating.** Die Zellpopulation wurde über das Vorwärts(FSC)- und Seitwärtsstreulicht (SSC) definiert. In einem zweiten Schritt wurden die Dimensionen Ausdehnung (area A) und Höhe (height H) des Vorwärtsstreulichts gegeneinander abgetragen. Da Zellen in beiden Dimensionen korrelierende Werte aufweisen, befinden sie sich annähernd in einer Diagonalen, auf diese Weise werden verklumpte Zellen aus der Wertung ausgeschlossen. Die Zahlen geben die gegateten Zellen in Prozent an. **(B) Streudiagramme.** Mithilfe der FlowJo-Software wurde das Seitwärtsstreulicht gegen die FITC-Konzentration (mean fluorescence intensity, MFI) aufgetragen. Links ist das Streudiagramm der Zellen, die lediglich den Detektionsantikörper erhielten, gezeigt. In der Mitte ist die positive Kontroll-VHH L-19.2a zu sehen, rechts die VHH L-13a. Die Zahlen in den Quadranten geben den Anteil der Zellen in Prozent an. **(C) VHH-Familien der Lamas 538 und 539 mit hCD38-Spezifität.** Die einzelnen Diagramme zeigen einen Vergleich der Bindung innerhalb der VHH-Familien. Jeweils oben ist die positive Kontroll-VHH und unten sind als negative Kontrollinstanz die nur mit den FITC-gekoppelten c-Myc-Antikörpern versetzten Zellpopulationen gezeigt. Cyan unterlegt ist das Familienmitglied, das den größten Fluoreszenzanstieg bewirkte. Gezeigt sind lediglich die bindenden VHHs.

Ergebnisse

L-8a	JK36	539	LSCAASGIILRIYDMGWYRQAPGKQRELVAAITSRGS---TNYADxxVYYCNADHTFAGVY
L-8b	JK24	539	LSCAASGIILRIYDMGWYRQAPGKQRELVAEITSGGS---TNYADxxVYYCNAHHTFAGAY
L-8c	JK30	539	LSCAASGIILRIYDMGWYRQAPGKQRELVAAITSGGR---TNYADxxVYYCNADHTFAGVY
L-8d	JK32	539	LSCAASGSTLRLRYDMGWYRQADGKQRELVAEITSGGS---TNYANxxVYYCNAEHTFMGAY
L-8e	JK31	539	LSCAASGIILRLRYDMGWYRQTPGKQRELVAEITSGGS---TNYADxxVYYCNADHTFAGVY
L-9.1a	JK 2	538	LSCVGSERIFSRNTMGWYRQAPGKQRELVGVVGSMTI---TNYADxxVYYCNYWHYAAGRDI
L-9.1b	JK42	538	LSCVASERIFSRNTMGWYRQAPGKQRELVAYITSLGI---ANYADxxVYN CNYWHYAAGRDI
L-9.2a	JK29	539	LSCVASGSISNIITMGWYRQAPGKQRE FVARIIIGGS---TGYS DxxVYYCNAGNPGTRYIY
L-9.2b	JK25	539	LSCVASGSISSIITMGWYRQAPGKQRE FVARVIIGGS---TG YADxxVYYCNAGNPGTSHY
L-13a	JK28	539	LSCAISGRTFIADMG-WFRQAPGKEREFQAGITWFGGS--TYYADxxIYYCAAGLKRIGDQREADY
L-13b	JK26	539	LSCAISGRTFINDMG-WFRQAPGKEREFQAGITWFGGS--TYYADxxIYYCAAGLKRIGDQREADY
u-13c	JK27	539	LSCAISGRTFIADMG-WFRQAPGKEREFQAGITWFGGS--TYYADxxIYYCAAGLKRIGDQREADY
L-14	JK44	538	LSCAASGRTDTRYTMGWFRQAPGKEREFVSGITWNGG---TSYADxxVYYCAADRFTLVPTTSDLDY
L-14.1a	JK22	539	LSCAASGRTLSNYAMAWFRQPGKEREFVASISASDS---TLYADxxVYYCAARFWIGVRAPAEYNY
L-14.1b	JK34	539	LSCAASGRTFSNYAMAWFRQPGKEREFVAAISAADS---TLYADxxVYYCAARWWIAVRAPAEYNY
L-15.4	JK19	539	LSCAASGRTFVSGMGWFRQAPGKEREFVAAINWRGST-TAYADxxIYYCAEGRTASASTMIREYDS

Abb. 4.6: Aminosäuresequenzen der bindenden VHH-Familien der Lamas 538 und 539. Die Übersicht zeigt die sieben bindenden VHH-Familien der Lamas 538 und 539, sortiert nach der CDR3-Länge. Angegeben sind ebenfalls die Nummer des Klons sowie das Lama, dem er entstammt. Cyan unterlegt ist das Familienmitglied, welches für die Umklonierung in einen eukaryotischen Expressionsvektor gewählt wurde. Beim Vorkommen identischer Isolate ist von diesen nur eines abgebildet. Die weiteren Modi der Abbildung entsprechen **Abb.4.2**.

4.1.4.1 VHHs aus Lama 10 und 25

Eine Analyse gleichen Aufbaus diente der Darstellung der Spezifität von jeweils vier der vor dieser Arbeit isolierten VHH-Familien der Lamas 10 und 25 (Unger, 2012). Verwendet wurden 25 ng VHHs aus aufgereinigten Periplasmalysaten und zur Detektion 150 ng des c-Myc-spezifischen, Fluorochrom-konjugierten Antikörpers. Jedes Diagramm zeigt eine Familie mit den positiven Kontroll-VHHs oben und den Zellen, die nur mit dem Detektionsantikörper inkubiert wurden, als negativer Kontrollinstanz unten. Maßstab der Anordnung der VHHs innerhalb der Familien ist der Anstieg in der Fluoreszenzintensität. Cyan unterlegt ist die VHH, die den stärksten Fluoreszenzanstieg bewirkt.

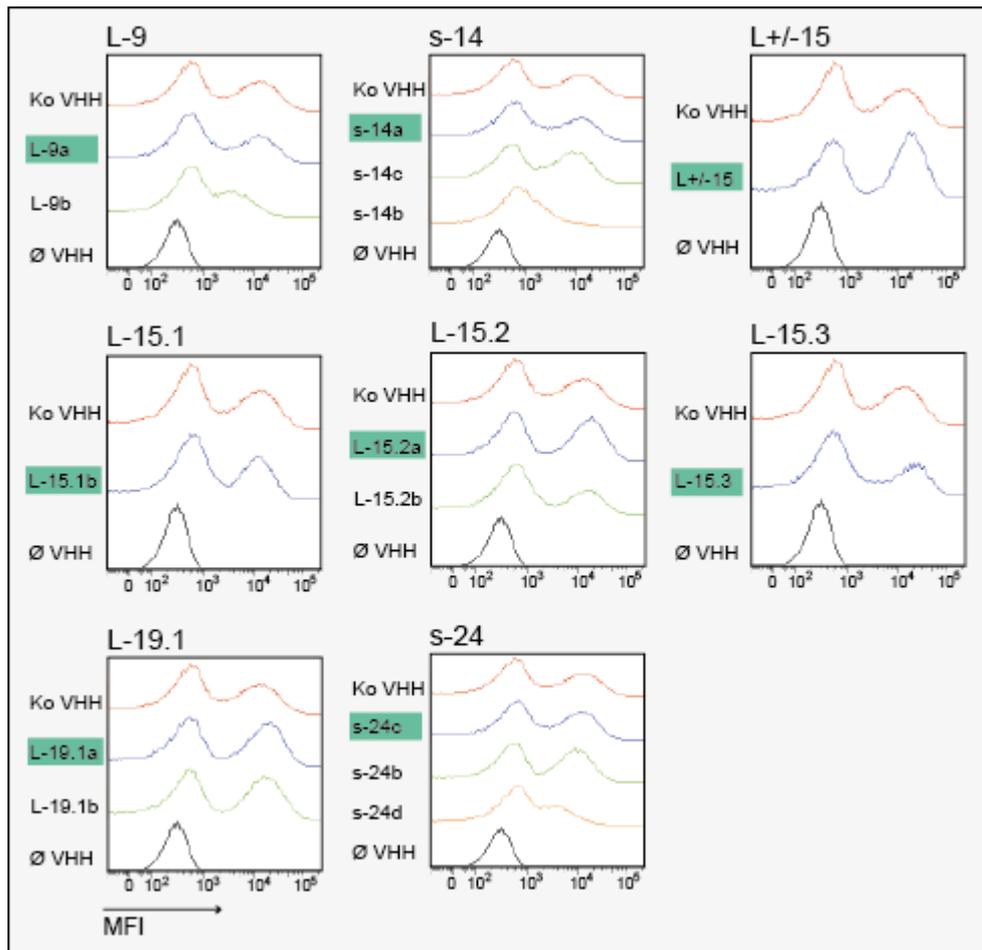


Abb. 4.7: Spezifität der VHH-Familien aus den Lamas 10 und 25. Jeweils $0,5 \times 10^6$ murine, untransfizierte und $0,5 \times 10^6$ mit hCD38 stabil transfizierte DC27.10-Zellen wurden mit 25 ng VHHs aus aufgereinigten Periplasmalysaten für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dreimal gewaschen. Zur Detektion wurden die Zellen anschließend mit 150 ng eines FITC-gekoppelten c-Myc-Antikörpers weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und zwei weiteren Waschschritten unterzogen. Im Anschluss wurde die Anfärbung durchflusszytometrisch analysiert. Die einzelnen Diagramme zeigen einen Vergleich des bewirkten Fluoreszenzanstiegs innerhalb der Familien. Jeweils oben ist die positive Kontroll-VHH und als negative Kontrollinstanz unten sind die nur mit FITC gekoppelten anti-c-Myc-Antikörpern versetzten Zellpopulationen gezeigt. Cyan unterlegt ist jeweils das Familienmitglied, das den größten Fluoreszenzanstieg bewirkte.

Ergebnisse

L-9a	MU370	25	LSCRYSGGFVFRVSSMGWYRQAPGNQR-ELIATITVGGK---TNYxVYYCNLASTAVGADT
L-9b	MU375	25	LSCATASGLLFRLASMG-WYRQAPGKER-ELIATITVGGK---TNYxVYYCNTASPAVGADT
L+13	MU1055	10	LSC EASGLTLSNYAIG-WFRQAPGKER-EVVS CIFTGG---TIVxVYYCAADPWGVCTDLRPNY
S-14a	MU738	10	LSCAGSGRTFTNYDMG-WFRQAPGKER-RFVA AISGSGS---ARYxVYYCAADRFVVAAGTHDLDY
S-14b	MU728	10	LSCAGSGRTFSSYAMG-WFRQAPGKER-ELVA VISSGGR---TNYxVYYCAADRFVAVATGTHDLDY
S-14c	MU737	10	LSCAGSGRSFSSYAMG-WFRQAPGKER-EIVATI TRSGS---TNYxVYYCAADRFVAVASGTHDLDY
S-14d	MU43	10	LSCAGSGRTFSSYAMG-WFRQAPGKER-EFVA AITSGS---TYYxVYYCAADRFVVAVGTHDLDY
S-14e	MU727	10	LSCAGSGRTFSSYAMG-WFRQAPGKER-EFVA S ISWGSR---TNYxVYYCAADRFVA I GTHDLDY
L-15.1b	MU1068	25	LSCVSGSGRTFSDWAMG-WYRQAPGKDR-EFVA AVS GAGRGKPSYxVYYCAADRLVLVALSIADPGF
L-15.1a	MU397	25	LSCAPSGGTFDAYDMG-WYREAPGKER-QFVA AVRSGGTT--TRYxLYYCAADRWGLFSLSIATPTH
L-15.2a	MU274	25	LSCAASGVSFSRYTMG-WYREVPGKERRE FVA AVRP S GDS---TYYxVYYCAAGFPVLVALSIADPDY
L-15.2b	MU413	25	VSCAASGLSFTRYTMG-WYREVPGKERRE FVA AVK P A G D S---AYYxIYYCAAGFPVLTALHIADPDY
L-15.3	MU1053	10	LSC T G S G R T F R N Y P M A - W F R Q A P G K E R - E F V A G I T W V G A S --- T L Y x V Y S C A A G R G I V A G R I P A E Y A D
L+/-15	MU415	10	LSC TVSGFTSDDYTVG-WFRQAPGLKR-EGLS LSRRDGR--FYHxVYYCAATTSVVVLLAPNWY EY
L-19.1a	MU523	25	ISCAVSGVRLDNYAMG-WFRQAPGKER-ESVA GISWSSGT--LLYxVYYCAAQYQDRYDEFWKEKMDY
L-19.1b	MU1065	25	LSCAASGPHFN NYAIG-WFRQAPGKER-EFVA GISWSSGS---LLYxLYYCAAQYQERYSDFSLKEKMEY
L-19.2a	MU1067	25	LSCVSGSGRRFDNYAMA-WFRQAPGKER-TFVA AISWSSGT--TRYxVYYCAARYQPRYDSDGMDGYEYEF
L-19.2b	MU551	25	LSCVSGSGSRFDNYAMG-WFRQAPGKER-EFVA AISWSSGT--TRYxVYYCAARYQPRYDSDGMDGYEYDN
S-24c	MU1105	10	LSCAASGFTFDDYVIG-WFRQAPGKER-EGVS ISSSGS---IYYxVYFCAADVTLNPF TGWDTRSGPMRYEYDY
S-24a	MU54	10	LSCAASGFTFDDYIIG-WFRQAPGKER-EGIS YISSSAGS---VYYxVYYCAADVTLNPF TGWDTRSGPMRYEYDY
S-24b	MU1103	10	LSCAASEFTFDDYVIG-WFRQAPGKER-EGVS ISSSDG----TYYxVYYCAADVTLNPF TGWTTRSGPMRYEYDY
S-24d	MU725	10	LSCAASGFTFDDYVIG-WFRQAPGKER-EGVS ISNNNS---TYYxVYYCAADVTLNPF TGWNTRSGPMRYEYDY

Abb. 4.8: Aminosäuresequenzen der untersuchten VHH-Familien der Lamas 10 und 25. Die VHH-Familien der Lamas 10 und 25 sind jeweils sortiert nach der CDR3-Länge. Angegeben sind ebenfalls die Nummer des Klons sowie das Lama, dem er entstammt. Cyan unterlegt ist das Familienmitglied, welches für die Umklonierung in einen eukaryotischen Expressionsvektor gewählt wurde. Beim Vorkommen identischer Isolate ist von diesen nur eines abgebildet. Die weiteren Modi der Abbildung entsprechen **Abb. 4.2**.

4.1.4.2 Die VHHs aus den Lamas 10, 25, 538 und 539 zeigen keine Spezifität für murines CD38

Die Analyse wurde nach dem gleichen Prinzip mit murinen YAC-Lymphomzellen, die kein murines CD38 exprimieren, und murinen EL4R Zellen, die in hohem Maß murines CD38 exprimieren, durchgeführt. Beide Zelllinien weisen kein humanes CD38 auf. 25 ng VHHs und 150 ng des c-Myc-spezifischen Antikörpers wurden verwendet. Als positive Kontrolle diente ein etablierter Antikörper gegen murines CD38. Keine der selektionierten VHHs bindet an murines CD38 (Ergebnisse nicht gezeigt).

4.1.4.3 Zur Weiterarbeit ausgewählte Repräsentanten der VHH-Familien

Durch die Analysen zur Spezifität wurde für jede der VHH-Familien ein Repräsentant ermittelt, mit dem die Weiterarbeit erfolgte. **Abb.4.9** zeigt eine Übersicht der hCD38-spezifischen VHH-Familien der vier Lamas 10, 25, 538 und 539, welche durch zwei unterschiedliche Immunisierungs- und Panningstrategien gewonnen wurden (**1.3.1; 4.1.1**). Die VHHs sind hinsichtlich der Länge und Sequenz ihrer CDR3-Regionen in Familien

eingeteilt. Einige VHHs wurden in Variationen mehrfach aus den Phagenbibliotheken isoliert, diese Familien werden jeweils durch das Mitglied repräsentiert, welches im intrafamiliären Vergleich die größte Affinität zeigte. Die Anzahl der Klone mit identischer Sequenz sowie die Anzahl der intrafamiliären Unterschiede der Sequenz sind angegeben. Bei variierender CDR3 sind die Aminosäuren, welche differieren, kenntlich gemacht. Während Familie L/u-13 in der gesamten Sequenz nur ein bis zwei abweichende Aminosäuren aufweist, die durchgängig nicht die CDR3 betreffen, finden sich in Familie L-15.1 bis zu 38 unterschiedliche Aminosäurereste. Die Repräsentanten wurden in den eukaryotischen Expressionsvektor pCSE2.5 umklont, der die Produktion in HEK293-6E-Zellen erlaubt.

Familie	Lama	Isolate	Varianten	Differenzen	CDR3
L-8	539	1	5	3-10	DHTFAGVY
L-9	25	4	2	11	ASTAVGADT
L-9.1	538	1	2	8	WHYAAGRDY
L-9.2	539	1	2	8	GNPGRYIY
L/u-13	539	2	3	1-2	GLKRIGDQREADY
s-14	10	13	5	12-14	DRFVVAAGTHLDY
L-14	538	1	1	0	DRFTLVPTTSDLDY
L-14.1	539	2	2	7	RFWIGVRAPAEYNY
L+/-15	10	8	1	0	TTSVVVLLAPNWYDY
L-15.1	25	2	2	38	DRLVLVALSIADPGF
L-15.2	25	27	2	21	GFPVLVALSIADPDY
L-15.3	10	9	1	0	GRGIVAGRIPAEYAD
L-15.4	539	1	1	0	GRTASASTMIREYDS
L-19.1	25	9	2	20	QYQDRYYDEFTWKEKMDY
L-19.2	25	3	2	6	RYQPRYDSDGMDGYEYEF
s-24	10	1	4	11-13	DVTLNPFPGWDRSGPMRYEYDY

Abb. 4.9: Übersicht über die selektierten, hCD38-spezifischen VHH-Familien aus den Lamas 10, 25, 538 und 539. Die systematische Einordnung in Familien und deren Bezeichnung reflektiert das Vorkommen einer *short hinge*, *long hinge* oder *unknown hinge* (s/l/u), das Vorkommen eines extra Cysteinpaares (-/+) gefolgt von der Anzahl der Aminosäuren in der CDR3. Die CDR3 zeigt die Abfolge der Aminosäuren im Einbuchstaben-Code. Die Kategorie der Isolate spiegelt die Anzahl identischer Klone des Repräsentanten beim Panning der Phagen-Display-Bibliotheken wider. Die jeweils identischen Klone der übrigen Familienmitglieder sind im Anhang aufgeführt. Mit der Bezeichnung der Varianten wird die Anzahl der Klone mit ähnlicher Aminosäuresequenz bzw. der Mitglieder einer Familie aufgezeigt. Die Kategorie der Differenzen bezieht sich auf die Anzahl variierender Aminosäurereste innerhalb einer Familie. In der CDR3-Region sind die in verwandten Sequenzen abweichenden Aminosäuren rot dargestellt. Zugrunde gelegt ist die Sequenz desjenigen Familienmitglieds, welches für die Umklonierung ausgewählt wurde.

4.1.5 Umklonierung in den Vektor pCSE2.5 und Expression in HEK293-6E-Zellen

E.coli-basierte Expressionssysteme zeigen sich durch die Kontamination mit Endotoxinen der Bakterien (*E.coli*-Lipopolysaccharid) sowie eine ungleichmäßige Produktion und Proteolyse der C-terminalen *tags* beeinträchtigt (Unger et al., 2015). HEK293-6E-Zellen sind adhärent wachsende, humane, embryonale Nierenzellen, die durch Transformation mit Teilen des humanen Adenovirus Charakteristika einer Krebszelle aufweisen. Sie zeigen in der Produktion von sezernierten Proteinen nach transienter Transfektion eine gleichmäßig hohe Rate (Zhang et al., 2009, Jäger et al., 2013). Um die Vorteile dieses eukaryotischen Expressionssystems zu nutzen, wurde die Überführung der VHH-kodierenden Inserts in den kompatiblen, eukaryotischen Expressionsvektor pCSE2.5 vorgenommen, der für die sekretorische Proteinexpression in eukaryotischen Zellen optimiert ist (Zhang et al., 2009, Jäger et al., 2013).

4.1.5.1 Umklonierung

Die ausgewählten Inserts (**Abb. 4.9**) aus Lama 10 (s-14, L+/-15, L-15.3 und s-24), Lama 25 (L-9, L-15.1, L-15.2 und L-19.1), Lama 538 (L-9.1, L-14) und Lama 539 (L-8, L-9.2, L/u-13, L-14.1 und L-15.4) wurden im Zuge der Umklonierung jeweils mit zwei unterschiedlichen C-terminalen *tags* fusioniert (**Abb. 4.10**). Bei der ersten Variante wurden die VHHs mit einem 6xHIS- und c-Myc-*tag* versehen, in einer zweiten Variante wurden die VHHs vor den Fc-Teil des humanen IgG1 kloniert, sodass sich in Lösung über Ausbildung von Disulfidbrücken in der *hinge*-Region ein Schwere-Ketten-Antikörper in Form eines VHH-hFc-Fusionsproteins bildet. Dies ermöglicht ein Wirkspektrum, das die Auslösung immunologischer Abwehrmechanismen wie CDC oder ADCC (**1.2.1, 1.2.2**) einschließt.

Zu diesem Zweck wurden die im pHEN2-Vektor enthaltenen, VHH-kodierenden Inserts durch PCR vervielfältigt. Das Ergebnis der PCR wurde durch Agarose-Gelelektrophorese isoliert, indem die entsprechenden Banden aus dem Gel herausgeschnitten und aufgereinigt wurden. Die vervielfältigte DNA wurde anschließend einem Restriktionsverdau mit den Endonukleasen NcoI und NotI unterzogen. Lag intern eine NcoI-Schnittstelle vor, wurde mithilfe des Vorwärts-Primers in der PCR eine PciI-Schnittstelle eingefügt, und die vervielfältigte DNA konnte alternativ mit den Restriktionsenzymen NotI und PciI geschnitten werden, da PciI und NcoI kompatible Übergänge generieren.

Die pCSE2.5-Vektoren wurden ebenfalls durch NcoI und NotI geschnitten und anschließend einer Dephosphorylierung unterzogen, um eine Religation zu vermeiden. Nach Isolation durch Agarose-Gelelektrophorese erfolgte die Ligation von Inserts und Vektoren im

Thermocycler. Die mit Inserts beladenen Vektoren wurden in ultrakompetente *E.coli* XL-10-Gold-Zellen transformiert und ihre Sequenz analysiert.

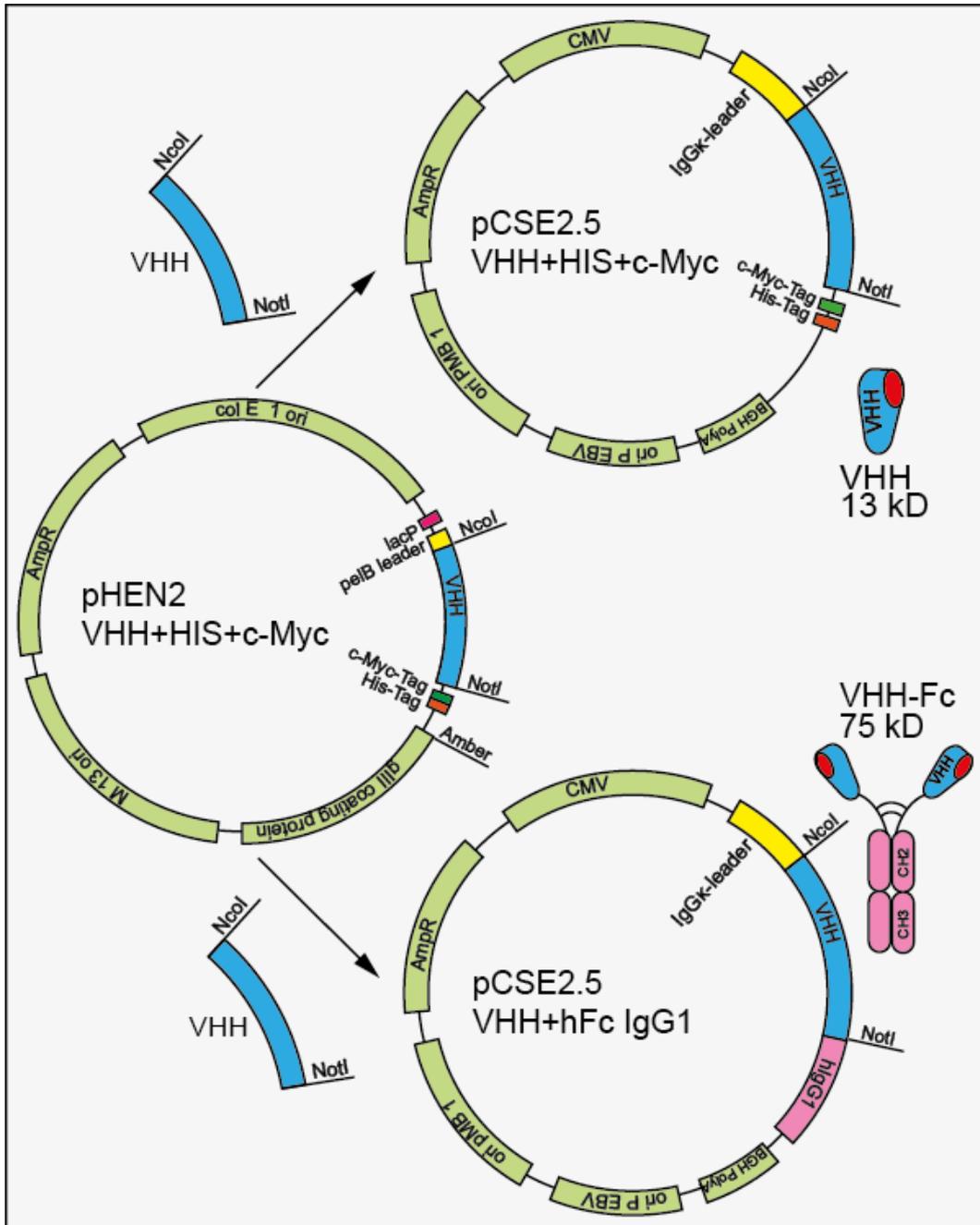


Abb. 4.10: Umklonierung von VHH-kodierenden Inserts aus dem Vektor pHEN2 in den eukaryotischen Expressionsvektor pCSE2.5 mit c-Myc-6HIS-tag und als Fc-Fusionsprotein. Die VHH-Inserts wurden nach Vervielfältigung durch PCR mit den Restriktionsendonukleasen NcoI bzw. PciI und NotI aus dem pHEN2-Phagemidvektor ausgeschnitten. Sofern eine interne NcoI-Schnittstelle vorlag, wurde zuvor in der PCR eine zusätzliche PciI-Schnittstelle eingefügt. Eukaryotische pCSE2.5-Vektoren wurden über dieselben Schnittstellen verdaut, und das Rückgrat wurde durch Gelelektrophorese isoliert und dephosphoryliert, anschließend erfolgte die Ligation. Dabei wurden die VHHs jeweils in Formate mit zwei unterschiedlichen C-terminalen tags überführt. Bei der ersten Variante wurden die VHHs mit einem 6xHIS- und c-Myc-tag versehen. In einer zweiten Variante wurden die VHHs vor einen humanen IgG1-Fc-Teil eingefügt.

4.1.5.2 Transfektion

Es folgte die Proteinproduktion der umklonierten VHH-kodierenden Inserts durch ein eukaryotisches Expressionssystem. Die für die transiente Transfektion verwendeten HEK293-6E-Zellen zeichnen sich durch die Möglichkeit ihrer Kultivierung in serumfreiem Medium und damit einhergehender Reduktion von Kontaminationen aus. Die Vektoren wurden mit dem kationischen Polymer Polyethylenimin inkubiert, das mit der negativ geladenen DNA Komplexe bildet, die bei der Transfektion durch Anlagerung an die Zellmembran endozytotisch aufgenommen werden. Gemäß der „*proton sponge hypothesis*“ schützt Polyethylenimin als potenter pH-Puffer die DNA zusätzlich vor Degradation in Lysosomen und sorgt durch osmotische Schwellung für die Freisetzung aus den Organellen, sodass die DNA an ihren Bestimmungsort, den Nukleus, gelangen kann (Jäger et al., 2013). Nach Vorbereitung der Zellen durch Überführung in ein Transfektionsmedium wurden sie mit pCSE2.5-Vektoren und den darin enthaltenen VHH-kodierenden Inserts transfiziert, nach 24 Stunden wurde ein Feeding-Medium zugegeben, und die Überstände wurden nach weiteren fünf Tagen geerntet und mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert. Die Transfektionskulturen beinhalten 30 ml, Testtransfektionen hatten eine Größe von 5 ml.

Abb. 4.11 zeigt in jedem Überstand eine deutliche Bande, die jeweils dem erwarteten Molekulargewicht der rekombinanten VHHs entspricht. Für VHHs mit c-Myc-6xHIS-*tag* liegt der Wert bei 15-20 kDa, für Fc-Fusionsproteine bei 45 kDa. Im Vergleich mit der Expression durch *E.coli* zeigen sich wesentlich weniger zusätzliche Banden im Gel, diese größere Reinheit lässt auf weniger Kontaminationen durch die serumfreie Kultivierung schließen. Insbesondere der Verlust der *tags* der VHHs durch Proteasen konnte verhindert werden, wie sich durch das Fehlen der entsprechenden Banden zeigt. Die wenigen zusätzlichen, schwachen Banden entsprechen endogenen Proteinen aus den HEK-Zellen, die durch Aufreinigungsverfahren im Weiteren isoliert werden konnten. Während die Ausbeute im prokaryotischen Expressionssystem mit *E.coli* zu Werten von ca. 10 µg VHHs bezogen auf 1 ml Kultur führte, liegen die Werte im eukaryotischen HEK-Zell-Expressionssystem für die VHHs mit c-Myc-6xHIS-*tag* mit durchschnittlich 50-100 µg VHHs bezogen auf 1 ml Kultur deutlich höher. Die VHHs L-9 und L-15.2 weisen eine Proteinmenge von ca. 0,1 µg/10 µl auf, dies entspricht einem Gesamtertrag von 10 µg/ml HEK-Zell-Kultur. Die VHHs L-9.2, L-15, L-15.1, L-15.3 und L-19 zeigen eine Proteinmenge von ca. 0,5 µg/10 µl, entsprechend einem Gesamtertrag von 50 µg/ml HEK-Zell-Kultur, die übrigen VHH-Überstände beinhalten mindestens 100 µg/ml HEK-Zell-Kultur. Die Expressionsraten der VHH-Fc-Fusionsproteine erwiesen sich als höher, sie lagen für alle VHH-Fcs bei 100-200 µg/ml HEK-Zell-Kultur.

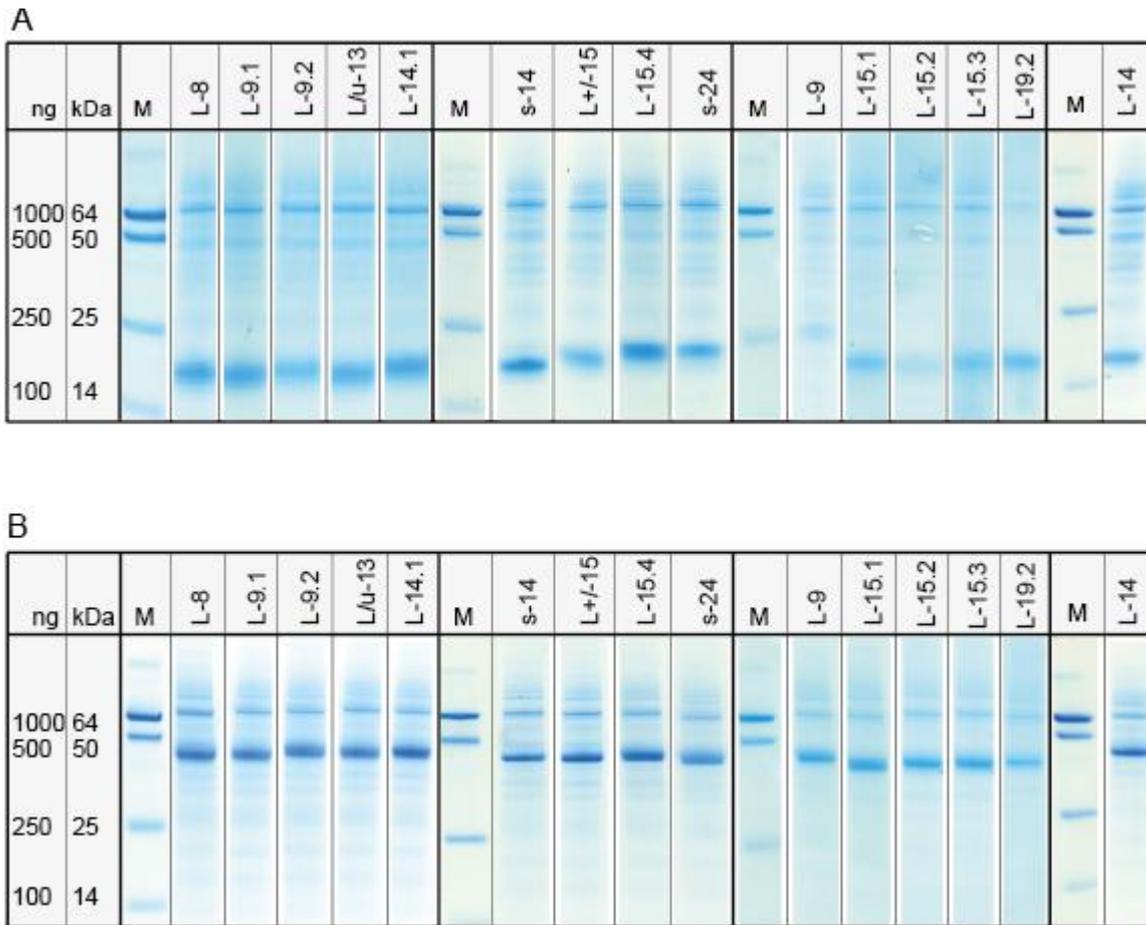


Abb. 4.11: Expression der CD38-spezifischen VHHs als sezernierte Fusionsproteine in HEK293-6E Zellen.

HEK293-6E-Zellen wurden mit den in pCSE2.5-Vektoren enthaltenen VHH-kodierenden Inserts transfiziert, nachdem diese zuvor mit dem Polymer Polyethylenimin inkubiert worden waren. Nach 24 Stunden wurde ein Feeding-Medium zugegeben, und nach fünf weiteren Tagen der Kultivierung in serumfreiem Transfektionsmedium wurden die Überstände der Zellen geerntet. Bei den Transfektionen betrug die Größe der Zell-Kultur 30 ml, für Testtransfektionen wurden 5 ml Kulturen verwendet. Die Proteine in den Überständen wurden in Proben von 10 µl mittels SDS-PAGE größenfraktioniert und mit Coomassie gefärbt. Als Größenstandard diente ein Marker (M). **(A) VHHs mit c-Myc-6xHIS-tag.** In der Höhe von 15-20 kDa sind die Banden der VHHs mit c-Myc-6xHIS-tag sichtbar. Anhand des Vergleichs mit dem Marker lassen sich die Proteinmengen pro Bande auf 0,1-1 µg schätzen. Die VHHs L-9 und L-15.2 weisen eine Proteinmenge von ca. 0,1 µg/10 µl auf. Die VHHs L-9.2, L+/-15, L-15.1, L-15.3 und L-19 zeigen eine Proteinmenge von ca. 0,5 µg/10 µl. Die übrigen VHH-Überstände beinhalten mindestens 1 µg/10 µl. **(B) VHH-hlgG1-Fc-Fusionsproteine.** Bei 45 kDa zeigen sich die VHH-hFc-Fusionsproteine. Die Banden zeigen eine durchschnittliche Ausbeute von 1-2 µg/10 µl der VHH-Fc Fusionsprotein-Überstände.

4.1.5.3 Affinitätsaufreinigung

Die HEK293-6E-Zellüberstände der VHHs mit *c-Myc-6HIS-tag* konnten aufgrund der spezifischen Bindung von Histidin an Nickel-Ionen mithilfe von Ni-NTA aufgereinigt werden. Verwendet wurden Säulen der Firma Quiagen. Die Elution erfolgte mit Imidazol-Elutionspuffer in mehreren, anschließend gepoolten Fraktionen.

Die Aufreinigung der Überstände von HEK293-6E-Zellen, die transient VHH-Fc-Fusionsproteine exprimierten, konnte durch den Einsatz von Protein G, einem in der Zellwand von Streptococccen vorkommenden Protein, vorgenommen werden. Protein G besitzt Bindungsdomänen, die eine hohe Affinität für die Fc-Region von Immunglobulinen des Isotyps G besitzen. Verwendet wurden Säulen der Firma Quiagen. Die Elution erfolgte mit einem Glycin- und HCl-haltigem Elutionspuffer mit einem pH-Wert von 2,7. Neutralisiert wurden die Eluate anschließend durch einen TRIS-hydrochlorid-haltigem Puffer mit einem pH von 9.

Sowohl die Eluate der VHHs mit *c-Myc-6xHIS-tag* als auch der VHH-Fc-Fusionsproteine wurden zum Abschluss des Verfahrens einer Umpufferung auf eine Phosphat-gepufferte Salzlösung mit Calcium und Magnesium (PBS+/+) unterzogen, die in immunozytochemischen Analysen mit geringerem Zellverlust einhergeht. Die Konzentration der VHHs wurde quantitativ analysiert und mittels Amicon-Säulen auf ein festgelegtes Maß eingestellt. **Abb. 4.12** stellt die Analyse der einzelnen Schritte der Aufreinigungsverfahren mittels SDS-PAGE dar. Es konnte eine Ausbeute von 1-3 mg erzielt werden, sodass von keiner wesentlichen Minderung der Proteinmenge durch das Aufreinigungsverfahren auszugehen ist.

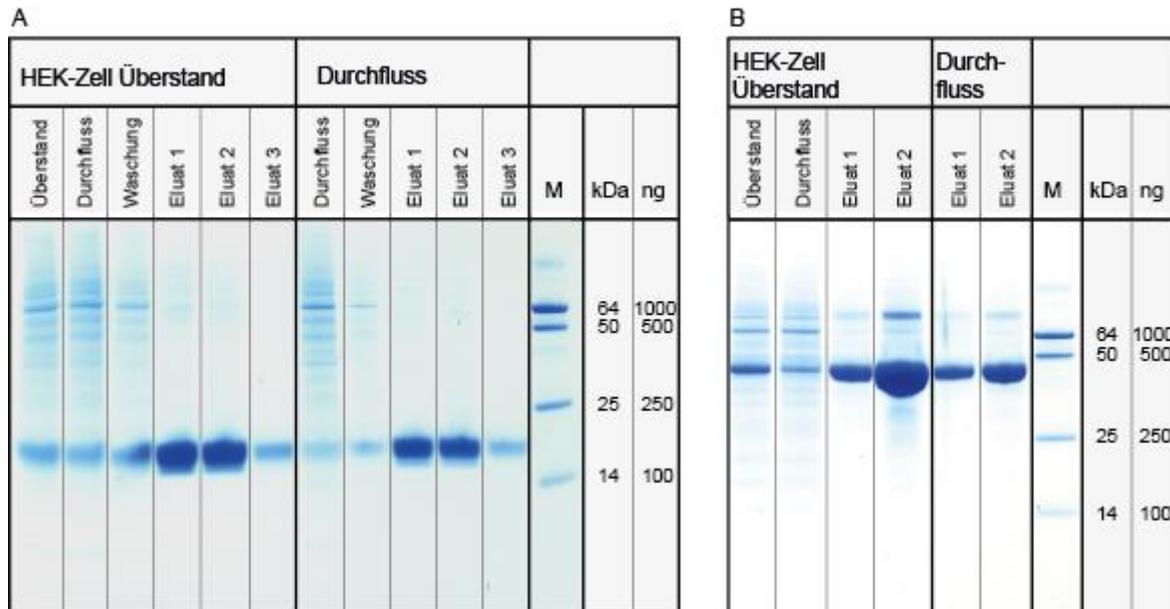


Abb. 4.12: Analyse des Aufreinigungsprozesses mittels SDS-Page. Gezeigt ist die Aufreinigung der VHH L-8. **(A) Aufreinigung von VHHs mit c-Myc-6xHis-tag über Nickel-NTA-Säulen mit einer Ausbeute von 1-3 mg/30 ml Überstand.** Mit 2 ml NiNTA befüllte Säulen wurden für die Gewinnung von 3,75 ml Eluat verwendet. 30 ml HEK293-6E Zellüberstände durchliefen die Säulen, eine Waschung mit PBS-/- erfolgte, und drei Eluate mit jeweils 1,25 ml wurden mit Elutionspuffer (250 mM Imidazol) gesammelt. Zur Gewinnung verbliebener VHHs wurde der Durchfluss erneut durch die Säulen gefiltert. Proben der einzelnen Arbeitsschritte wurden auf ihren Proteingehalt mittels SDS-Page mit einem Auftrag von 10 μ l pro Bande kontrolliert. Die Eluate wurden auf PBS+/+ umgepuffert und auf eine einheitliche Konzentration gebracht. **(B) Aufreinigung von VHH-Fc-Fusionsproteinen über Protein G-Säulen mit einer Ausbeute von 1-3 mg/30 ml Überstand.** Die VHH-Fc Fusionsproteine wurden durch 2 ml Protein G aufgereinigt. 30 ml HEK293-6E-Zellüberstände wurden durch die Säulen gefiltert und drei Eluate mit jeweils 1,25 ml Elutionspuffer (pH 2,7) gelöst. Zur Neutralisation wurde Neutralisationspuffer (pH 9) vorgelegt. Das weitere Vorgehen entsprach dem Aufreinigungsprozess der VHHs mit c-Myc-6xHis-tag.

4.2 Analyse der Bindungsstabilität und Epitope CD38-spezifischer VHHs

4.2.1 Analyse der Bindungsstabilität durch VHH-Titration

Im Zuge der weiteren Charakterisierung wurde zur Ermittlung der relativen Affinität zu humanem CD38 und Stabilität der Bindung eine Titrationanalyse der VHH-Monomere durchgeführt. Die aus HEK293-6E-Zellüberständen gewonnenen und aufgereinigten VHHs wurden zu diesem Zweck titriert und murine, stabil hCD38-transfizierte YAC-Zellen mit den verschiedenen VHH-Konzentrationen in einem Gesamtvolumen von 100 μ l inkubiert. Verdünnt wurden die VHHs zuvor fortlaufend um den Faktor $1:\sqrt{10}$, sodass die Ausgangskonzentration von 300 nM in sechs Schritten auf eine Konzentration von 0,3 nM gesenkt wurde. Durch die anschließende Inkubation von Zellen und VHHs mit 100 ng eines

c-Myc-6xHIS-*tag*-spezifischen, Fluorochrom-konjugierten Antikörpers konnten gebundene VHHs detektiert werden. Die durchflusszytometrisch ermittelten Werte der Fluoreszenzintensität wurden in Diagrammen gegen die logarithmisch dargestellte VHH-Konzentration aufgetragen (**Abb.4.13**). Die VHH-Familien der Lamas 10, 25, 538 und 539 sind getrennt in vier Diagrammen dargestellt. Als Kontrolle wurden Verdünnungsserien einer VHH, die nicht für humanes CD38 spezifisch ist, verwendet.

Durch den Kurvenverlauf der Titrationsreihe kann eine semiquantitative Aussage über die Bindungsaffinität der untersuchten VHHs getroffen werden. Bei negativ sigmoidal verlaufenden Kurven, wie sie die VHHs L-8, L-9, L-9.2, L/u-13, L-14.1, L-15.1, L-15.2, L-15.3, L-19.1 aufweisen, zeigt die Plateauphase jeweils das maximale Signal an, das bei der Inkubation der Antigen-exprimierenden Zellen erzielt werden konnte. Die Konzentration der jeweiligen VHHs bei halbmaximalem Signal stellt als Dissoziationskonstante (KD) ein Maß für die Affinität der VHHs zu ihrem Antigen dar.

Insgesamt zeigen sich neun Familien, die hochaffin an humanes CD38 binden (L-8, L-9, L-9.2, L/u-13, L-14.1, L-15.1, L-15.2, L-15.3, L-19.1), und sechs Familien, die mit einer niedrigen Affinität binden (L-9.1, s-14, L-14, L+/-15, L-15.4, s-24). Die mit der GraphPad Prism Software berechnete KD zeigt bei den hochaffin bindenden VHHs Werte, die im unteren nanomolaren Bereich (<10 nM) liegen und mit denen monoklonaler Antikörper vergleichbar sind (DeGenst et al., 2006).

Die Titrationsanalysen der VHH L-9.1 und der mit geringerer Affinität bindenden VHH L-14 aus Lama 538 zeigen einen Verlauf der Signalstärke, bei dem die Plateauphase nicht deutlich ablesbar ist. Unter der Annahme, dass das Signal der höchsten durchschnittlichen Fluoreszenzintensität bei der maximal verwendeten VHH-Konzentration bereits erreicht war, würden diese VHH-Familien Dissoziationskonstanten von 30–50 nM zeigen. In **Abb.4.13** sind die errechneten KD-Werte nebenstehend aufgeführt.

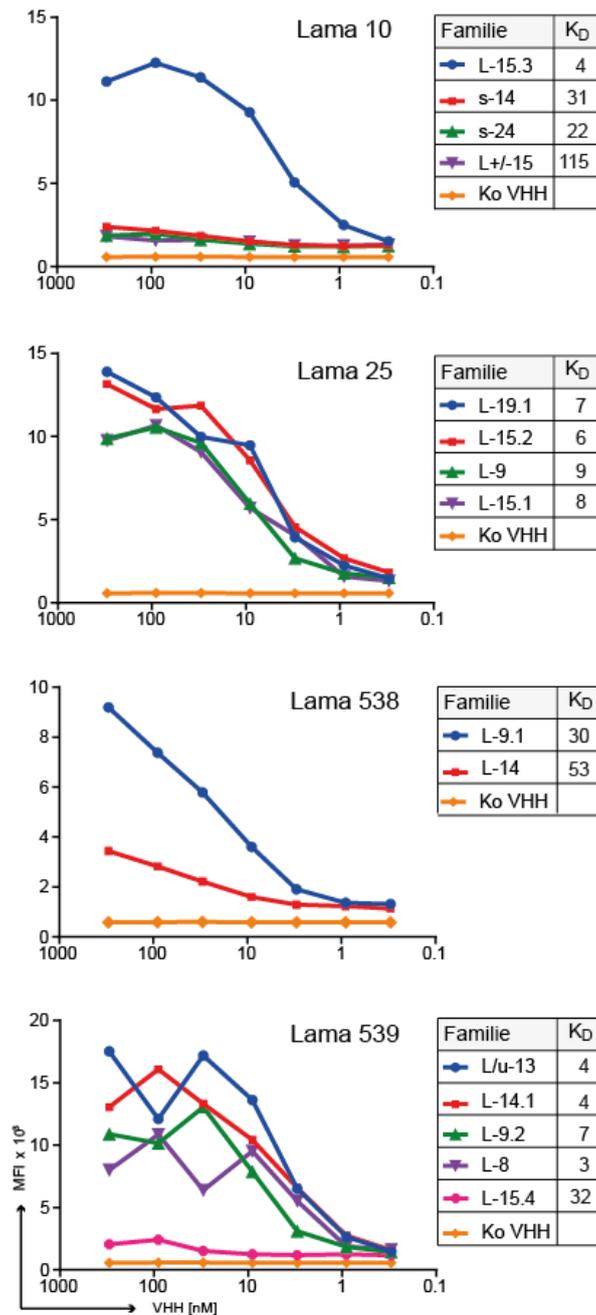


Abb. 4.13: Titrationsanalyse der hCD38-Affinität der VHH-c-Myc-6xHIS-tag-Monomere der Lamas 10, 25, 538 und 539. Stabil hCD38-transfizierte YAC-Zellen wurden mit VHHs in Konzentrationen von 0,3 μ M bis 0,3 nM inkubiert. Die Detektion erfolgte durch 100 ng eines c-Myc-spezifischen Antikörpers. Die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (mean fluorescence intensity, MFI) wurde am Durchflusszytometer gemessen und mithilfe der FlowJo-Software gegen die logarithmische Konzentration aufgetragen. Als Kontrollen wurden Verdünnungsserien von VHHs verwendet, die nicht spezifisch für hCD38 sind. Jeweils rechts angegeben ist die Dissoziationskonstante K_D , die mithilfe der GraphPad-Prism-Software ermittelt wurde. Einige Kurven zeigen einen Verlauf, bei dem die Plateauphase nicht ablesbar ist. Die angegebene Dissoziationskonstante weist in diesen Fällen einen Wert auf, der unter der Annahme steht, dass das höchste MFI-Signal bei der maximal verwendeten VHH-Konzentration bereits erreicht wurde.

4.2.2 Die VHHs zeigen keine Hemmung der Glykohydrolase-Aktivität

Im nächsten Schritt wurde getestet, ob die VHHs einen Effekt auf die Glykohydrolasetätigkeit des Enzyms CD38 zeigen. Für diese Analyse wurde die Eigenschaft des humanen CD38 genutzt, durch seine Funktion als NAD-Glykohydrolase das verfügbare extrazelluläre NAD zu limitieren und als Substrat für NAD-metabolisierende ADP-Ribosyltransferasen (ARTs) zu entziehen ((Deaglio et al., 2011, Koch-Nolte et al., 2006). ARTs und hCD38 können als Substrat auch etheno-NAD (e-NAD) verwenden, welches von den ARTs zur etheno-ADP-Ribosylierung von Oberflächenproteinen verwendet und durch Fluorochrom-konjugierte Antikörper gebunden wird, deren Epitop die etheno-Adenosin-Gruppe ist. Je mehr Oberflächenproteine e-ADP-ribosyliert werden, umso stärker wird das durchflusszytometrisch detektierte Signal. Wenn das humane CD38 als Konkurrent um das Substrat auftritt, werden entsprechend weniger Oberflächenproteine e-ADP-ribosyliert und das Signal ist geringer. Entsprechend sollte das Signal, sofern eine der VHHs die enzymatische Funktion von CD38 inhibiert, stärker werden, da die Konkurrenz der ARTs bezüglich ihres Substrates gehemmt wird. Beim Vergleich von YAC-Zellen, die nur stabil mit ART2.2 transfiziert waren (YAC), mit solchen, die sowohl mit ART2.2 als auch mit humanem CD38 transfiziert waren (YAC_hCD38), würde bei erfolgter Inhibition der enzymatischen Funktion von hCD38 ein ähnliches Signal wie bei YAC-Zellen erwartet werden.

Im Versuchsaufbau wurden daher YAC und YAC_hCD38 in getrennten Ansätzen mit den verschiedenen VHHs inkubiert und anschließend e-NAD hinzugefügt, bevor in einem dritten Schritt eine Inkubation mit dem e-Adenosin-spezifischen Antikörper vorgenommen wurde. Die Ergebnisse zeigen, dass in diesem Versuchsaufbau keine Verschiebung des Signals detektiert werden konnte, sodass die Bindung von CD38 durch alle isolierten VHHs keinen Unterschied zu dem Signal ohne den Zusatz von VHHs zeigt und somit das Substrat weiterhin gleichmäßig von beiden Enzymen umgesetzt wird. **Abb.4.14** zeigt als Beispiel die VHH-Familie L-19.1. Die nahezu identischen Ergebnisse, die mit den anderen VHH-Familien sowie den VHH-Fc-Fusionsproteinen erzielt wurden, sind nicht gezeigt.

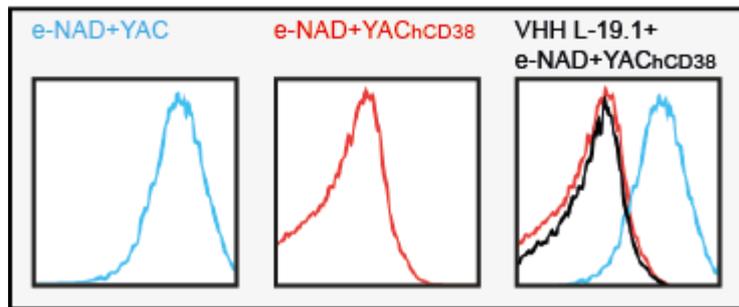


Abb. 4.14: Enzyminhibitions-Assay. YAC- und YAC_hCD38-Zellen wurden in getrennten Ansätzen mit jeweils 5 µg der selektierten VHHs und VHH-Fc-Fusionsproteine für 20 Minuten inkubiert und anschließend 1 µM e-NAD zugegeben. Zuletzt wurden die Ansätze mit 0,67 µg des e-Adenosin-spezifischen Antikörpers inkubiert, bevor sie mit dem Durchflusszytometer analysiert wurden. Links sind YAC-Zellen nach Zugabe von e-NAD und e-Adenosin-spezifischem Antikörper gezeigt (blau), in der Mitte YAC_hCD38-Zellen nach Zugabe von e-NAD und e-Adenosin-spezifischem Antikörper (rot) und rechts YAC_hCD38-Zellen, denen zusätzlich die VHH L-19.1 zugesetzt wurde (schwarz). Zu sehen ist, dass aus dieser Zugabe keine Veränderung des Signals gegenüber der roten Kurve resultiert, sodass e-NAD als Substrat weiterhin gleichmäßig von beiden Enzymen umgesetzt wird.

4.2.3 Epitopkartierung

Um festzustellen, ob die VHHs unterschiedliche Epitope auf der Oberfläche von humanem CD38 erkennen und inwiefern sich die Bindung unterschiedlicher Epitope auf die Charakteristik der einzelnen VHH-Familien auswirkt, wurde eine relative Epitopkartierung vorgenommen. Einige VHH-Familien der Lamas 10 und 25 konnten durch Kreuzblockade-Analysen bereits zwei Epitopen zugeordnet (Unger, 2012) und diese Epitope mit kokristallisierten, gebundenen VHHs in der Röntgenstrukturanalyse visualisiert werden. Das Prinzip der Epitopkartierung unter Verwendung von Blockade-Analysen beruht darauf, dass antigentragende Zellen nacheinander mit zwei VHHs inkubiert werden, von denen die zweite durch vorherige Fluorochromkonjugation als Detektions-VHH im Durchflusszytometer fungiert. Diese kann nur binden, wenn ihr Epitop durch die erste VHH nicht blockiert wurde. Der Informationsgehalt dieser Analysen liegt in der Feststellung, ob die Bindungsepitope identisch, räumlich entfernt oder partiell überlappend sind.

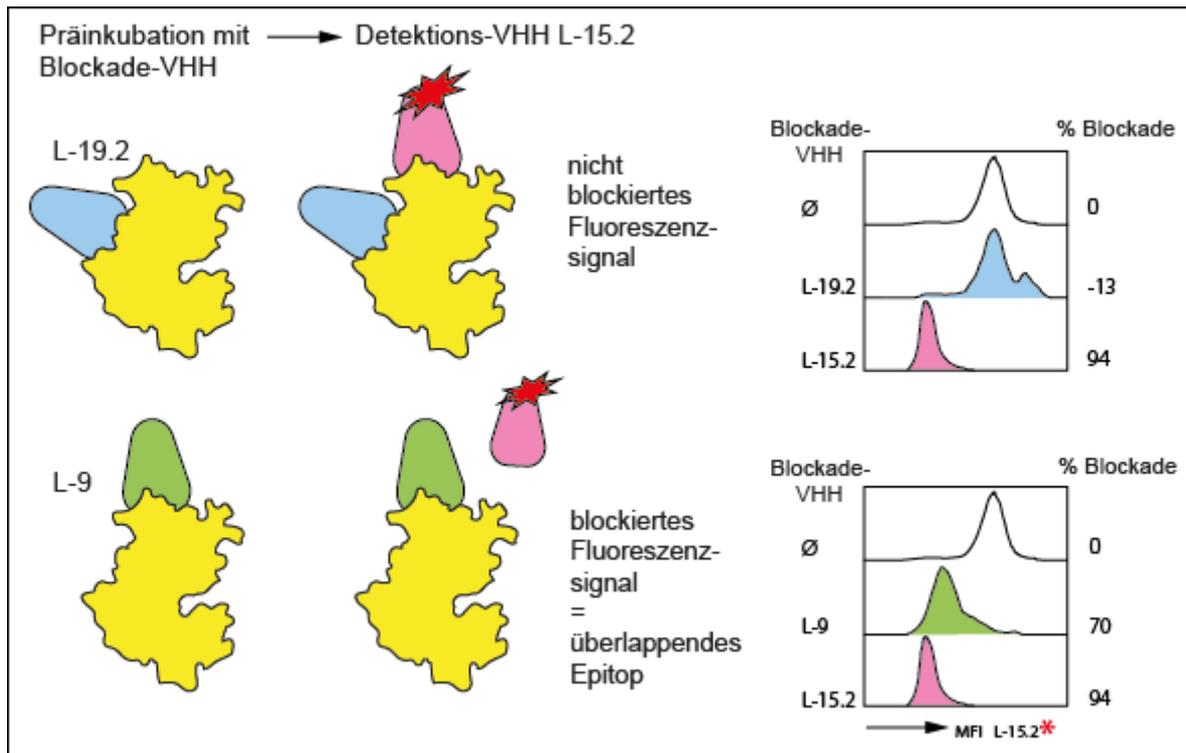


Abb. 4.15: Schematische Darstellung des Prinzips der Kreuzblockade. CD38-positive Zellen werden zuerst mit einer unkonjugierten VHH und zur Detektion anschließend mit einer Fluorochrom-markierten VHH inkubiert. Lässt sich in der durchflusszytometrischen Untersuchung ein Fluoreszenzsignal auffangen, konnte die Detektions-VHH binden und ihr Epitop überschneidet sich nicht mit der zu untersuchenden VHH (oben). Binden beide VHHs am selben Epitop, kann die Detektions-VHH nicht binden und es wird kein Signal aufgefangen (unten). Veranschaulicht wird das Prinzip anhand der Daten der VHHs L-9, L-19.2 und L-15.2 als Detektions-VHH, die letzten beiden wurden durch Kokristallisation in der Röntgenstrukturanalyse bereits visualisiert. Die nebenstehenden durchflusszytometrischen Analysen zeigen jeweils oben die maximale MFI bei ausschließlicher Inkubation mit der Detektions-VHH. Unten ist die Selbstblockade bei Präinkubation mit unmarkiertem L-15.2 zu sehen. Nebenstehend ist die Blockade als Differenz der % zwischen dem Fluoreszenzsignal ohne Zugabe von blockierenden VHHs und dem Signal nach Inkubation mit der jeweiligen Blockade-VHH angegeben.

Als Detektionsantikörper in den Blockade-Analysen wurden die aus aufgereinigten HEK293-6E Zellüberständen stammenden, hCD38-spezifischen VHHs L-8, L-9.1, L-15.1, L-15.2, L-15.4 und L-19.2 verwendet, die zuvor wahlweise an die Fluoreszenzfarbstoffe Alexa Fluor 647 oder 680 bzw. an APC 650 konjugiert worden waren. Für die Analyse wurden zunächst stabil hCD38-transfizierte, murine YAC-Zellen mit einem hohem Überschuss unkonjugierter VHHs für 30 Minuten inkubiert und anschließend eine zehnfach niedrigere Menge der Detektions-VHH zugefügt. Als Maßstab für eine unblockierte Bindung wurde die Detektions-VHH ohne vorherige Inkubation mit potenziell blockierenden VHHs verwendet. Als Kontrolle für eine erfolgreiche Blockade diente die Vorinkubation mit der gleichen VHH in unkonjugierter Form, die anschließend Fluorochrom-konjugiert zur Detektion eingesetzt wurde. Die MFI wurde mithilfe der Flowjo-Software ermittelt und für die einzelnen VHHs in Prozent des MFI-Wertes ohne Blockade-VHH umgerechnet. Der Grad der Blockade wurde

als Differenz des jeweiligen prozentualen Wertes der Blockade-VHH von dem prozentualen Wert ohne Blockade-VHH angegeben. Als Grenzwert für eine blockierende Wirkung wurde die Marke von 50 % festgelegt.

Basierend auf den Blockade-Analysen konnten die VHHs in verschiedene Cluster unterteilt werden (**Abb.16 A**). Die Blockade einzelner Repräsentanten aus diesen Clustern durch die gesamte Gruppe weist dabei auf ein räumlich identisches oder stark überlappendes Epitop der VHHs eines Clusters hin.

Die hochaffin bindende VHH L-19.2 aus Cluster 1 wurde aus dem Lama 25 isoliert (Unger, 2012) und außerhalb der Kreuzblockade-Analysen im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter charakterisiert. Als Detektions-VHH wird L-19.2 durch die VHH-Familie L-19.1 blockiert. Dies bestätigt das Ergebnis der Röntgenstrukturanalyse, die Vertreter beider Familien am gleichen Epitop verorten konnten, das sich am Übergang der N-terminalen zur C-terminalen Domäne an der vom katalytischen Zentrum abgewandten Seite befindet. Die VHH- L-19.1 bewirkt ebenfalls eine vollständige Blockade der VHH-Familie L-9.1, die eine Epitop-Überlagerung nahelegt. Die Blockadewerte der VHHs aus den übrigen Clustern, die mehrheitlich Werte zwischen 20 und 40 % annehmen, können durch die geringe Affinität der VHH L-9.1 mitbedingt sein. Für L+/-15 (52 %) und s-24 (53 %), die knapp den Grenzwert überschreiten, kann neben diesem Effekt auch eine sterische Komponente eine Rolle spielen.

Cluster 2 wird durch die Blockade der Detektions-VHHs L-15.1 und L-15.2 aus Lama 25 charakterisiert, die untereinander eine ähnliche Verteilung zeigen. Dies spricht ebenso wie ihre gegenseitige Blockade für ein weitgehend identisches Epitop. Da L-15.2 bereits kokristallisiert wurde, konnte das Epitop von L-15.1 und L-15.2 am C-terminalen Pol des humanen CD38 visualisiert werden. Cluster 2 enthält neben L-15.1 und L-15.2 die vollständig blockierend wirkenden VHHs L+/-15, L-9, L-14.1, L-15.3 und s-14. Die VHHs L-9.2 und L-14 lösen neben der Blockade von L-15.2 und L-15.1 ebenfalls eine Blockade der Detektions-VHH L-8 von Cluster 3 aus. Die VHH L/u-13 blockiert die Detektions-VHHs beider Cluster sogar vollständig, sodass eine intermediäre, die Epitope beider Cluster tangierende Lokalisation des Epitops von L/u-13 anzunehmen ist.

Weiterhin als keinem Cluster zugehörig ist das scFv- bzw. scFv-Fc-Fusionsprotein Dara, welches in seiner schweren und leichten Kette mit dem monoklonalen Antikörper Daratumumab übereinstimmt, aufgeführt. Die Lokalisation des Epitops dieses Proteins wird unter **4.3.2** genauer analysiert.

Die beiden bereits visualisierten Epitope, an denen die VHHs der Cluster 1 und 2 binden, sind die Bindungsstellen der meisten selektierten VHH-Familien. Die beiden dem Lama 539

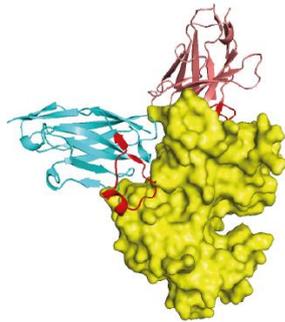
entstammenden VHHs L-8 und L-15.4 und die VHH s-24 des Lamas 10, die Cluster 3 bilden, binden andere Epitope, welche zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht lokalisiert wurden. Die Kreuzblockade-Analysen mit den Detektions-VHHs L-8 und L-15.4 zeigen, dass sie sich wechselseitig sowie außerdem die VHH-Familie s-24 blockieren, sodass von einer Kongruenz der Epitope auszugehen ist. Einen Hinweis auf die räumliche Nähe zu Epitop 2 liefert die Tatsache, dass beide Detektions-VHHs durch die VHH-Familie L/u-13 blockiert werden, die zusätzlich auf Cluster 2 wirkt. **Abb.4.16 B** veranschaulicht die Ergebnisse der Epitopkartierung von hCD38 und ordnet die VHHs in ihrer Gesamtheit anhand einer Schemazeichnung drei distinkten (1, 2 und 3) und einem überlappendem (2/3) Epitop zu.

A

		Detektions-VHhs						
		L-19.2a	L-9.1a	L-15.1b	L-15.2a	L-8a	L-15.4	
Blockierende VHhs	Cluster 1	L-19.1a	93	99	61	-10	35	-9
	L-19.2a	96	n. t.	63	-13	n. t.	n. t.	
	L-9.1a	5	97	-11	-9	5	4	
	L+/-15	6	52	97	94	3	-4	
	L-9a	4	40	79	70	-3	21	
	L-14.1a	-9	33	95	92	7	30	
	L-15.1b	9	18	91	80	-4	-29	
	L-15.2a	11	37	91	94	41	40	
	L-15.3	10	1	91	83	40	-31	
	s-14a	6	21	80	59	17	-8	
Cluster 2	L-14	5	40	74	69	59	27	
L-9.2a	6	31	95	92	82	-1		
L-13a	-4	23	94	91	92	98		
Cluster 3	L-8a	4	37	-11	-7	99	99	
L-15.4	0	23	-23	-13	99	99		
s-24c	9	53	10	-7	99	99		
Dara	33	53*	88	82	70*	77*		

*Dara als scFv-Fc-Fusionsprotein

B



C

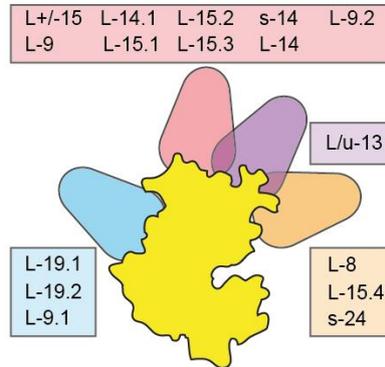


Abb. 4.16: **Relative Epitopkartierung durch Blockade-Analysen. (A) Prozentuale Blockade der hCD38-spezifischen Detektions-VHHs L-19.2, L-9.1, L-15.1, L-15.2, L-8 und L-15.4.** Die einzelnen Werte zeigen die prozentuale Differenz der ausschließlichen Bindung der Detektions-VHHs im Vergleich zur Bindung der Detektions-VHHs in Gegenwart der blockierenden VHHs. Aufgrund ihrer Blockadewirkung wurden die VHHs in Cluster eingeteilt. Graue Unterlegung weist auf eine Blockade von mehr als 50 % hin. Jeweils gerahmt sind die Werte der Selbst-Blockaden der Detektions-VHHs. Mit Dara ist das scFv (ohne Sternchen) bzw. scFv-Fc-Fusionsprotein (mit Sternchen) bezeichnet, welches in den Aminosäuresequenzen seiner VH und VL mit dem monoklonalen Antikörper Daratumumab übereinstimmt. Verwendet wurden pro Ansatz 1×10^6 stabil hCD38-transfizierte YAC-Zellen, die für 30 Minuten mit 1-2 μg unmarkierten VHHs und anschließend mit 0,1 μg Fluorochrom-konjugierten VHHs für 20 Minuten inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert wurden. Als Positivkontrolle diente die ausschließliche Inkubation mit der Detektions-VHH. **(B) Darstellung der bisher durch Röntgenstrukturanalyse visualisierten Epitope. An Epitop 1 bindet L-19.2 (blau) und an Epitop 2 bindet L-15.2 (rosa).** **(C) Schematische Übersicht der Epitopzugehörigkeit der CD38-spezifischen VHH-Familien aus den Lamas 10, 25, 538 und 539.**

4.3 Vergleichende Analyse Daratumumabs und CD38-spezifischer VHHs bezüglich der Bindungsepitope und der Zytotoxizität

4.3.1 Produktion eines hCD38-spezifischen scFv-Fc-Fusionsproteins

Als Maßstab für das Potenzial der selektierten VHH-Fc-Fusionsproteine zur Induktion von CDC wurde der bereits durch klinische Studien etablierte Antikörper Daratumumab zum Vorbild genommen, um ein scFv-Fc-Fusionsprotein zu generieren, das in den variablen Domänen der schweren und leichten Kette (VH und VL) mit denen des humanen monoklonalen Antikörpers übereinstimmt. Verbunden durch einen Linker aus Oligopeptiden wurden die kodierenden Sequenzen der VH und der VL als scFv von der Firma Life Technologies synthetisiert und zunächst im Vektor pMA-T durch *E.coli* exprimiert (**Abb.4.18 A**). Die erstellten Periplasmalysate weisen in der SDS-PAGE durch bakterielle Verunreinigungen mehrere Banden auf. Die erwartete Bande des Dara-scFv zeigt sich bei der Größe von 25-30 kDa. Durch den Vergleich mit dem Markerprotein kann die Ausbeute auf eine Konzentration von ca. 15 ng/ μl geschätzt werden. Aus 200 μl Periplasmalysat einer 5 ml-*E.coli*-Kultur ergibt sich eine ungefähre Ausbeute von 3 μg .

Um die Fusionierung an den humanen IgG1-Fc-Anteil mit einer gleichmäßigeren, reineren Produktion zu verbinden, wurde die Klonierung des Dara-scFv in den Vektor pCSE2.5 vorgenommen (**Abb.4.17**). Nach Verdau mit den Restriktionsendonukleasen NcoI und NotI wurde das kodierende Insert für das Konstrukt aus VH, Linker und VL für den Dara-scFv im Zuge der Umklonierung entweder mit einem c-Myc-6xHIS-tag oder mit dem Fc-Teil des humanen IgG1 fusioniert, mit dem sich über Ausbildung von Disulfidbrücken in der *hinge*-Region ein scFv-hFc-Fusionsprotein mit der Möglichkeit zur Auslösung immunologischer Abwehrmechanismen wie CDC oder ADCC bildet.

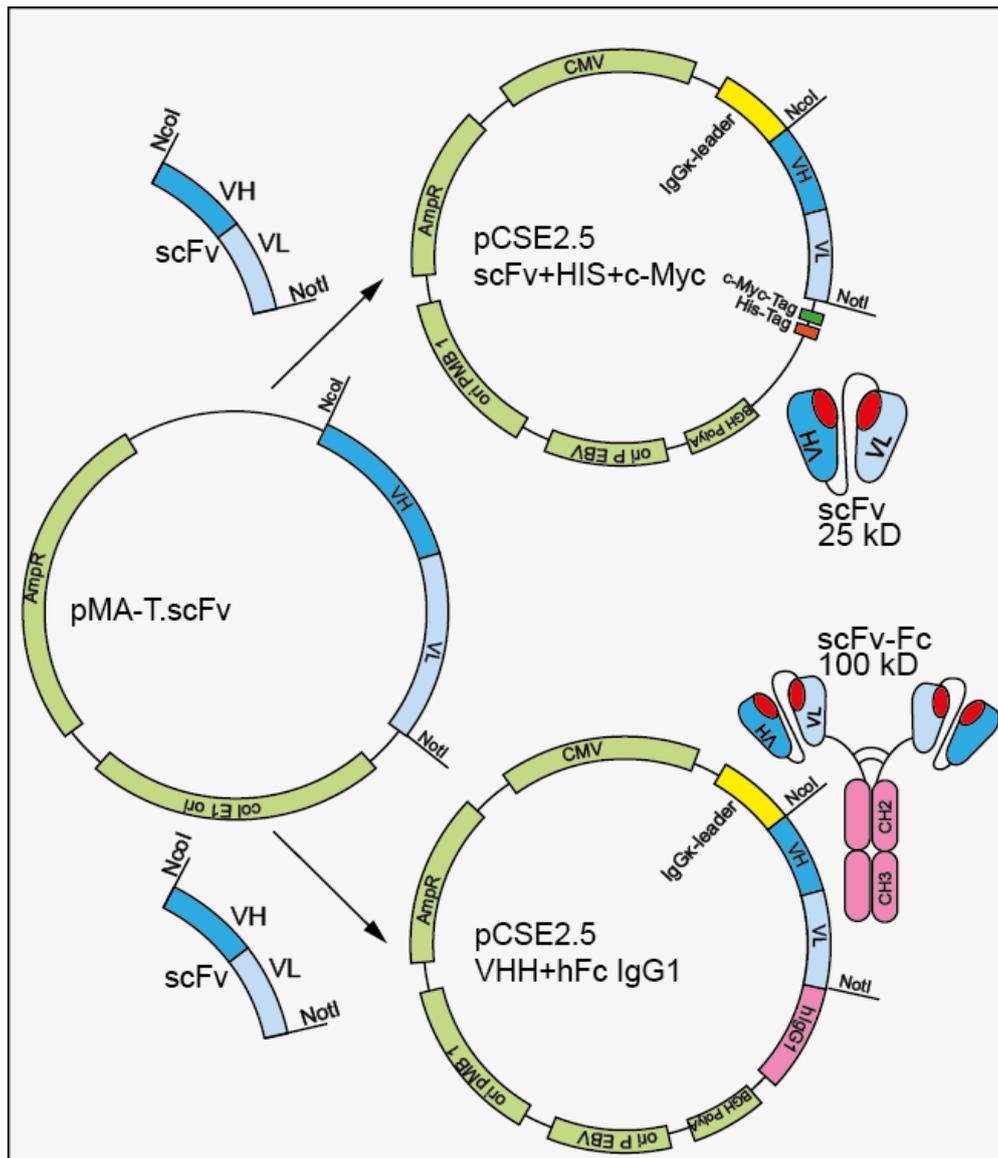


Abb. 4.17: Schematische Darstellung der Umklonierung von Dara-scFv aus dem Vektor pMAT.2 in den eukaryotischen Expressionsvektor pCSE2.5 in zwei Formaten. Nach Verdau kodierender Inserts und eukaryotischer pCSE2.5-Vektoren mit den Restriktionsendonukleasen NcoI und NotI kann Dara-scFv mit einem c-Myc-6xHIS-tag fusioniert oder vor den Fc-Teil des humanen IgG1 eingefügt werden.

Anschließend erfolgten die transiente Transfektion von HEK293-6E-Zellen und Expression in serumfreiem Medium. Der Überstand wurde mittels SDS-PAGE analysiert (**Abb.4.18 B**) und zeigt eine prominente Bande auf der Höhe von 50-60 kDa, der erwarteten molaren Masse des scFv-Fc-Fusionsproteins. Orientiert am Markerprotein kann die Konzentration für Dara-scFv-Fc auf ca. 100 ng/µl geschätzt werden. Mittels Protein G wurde anschließend eine Aufreinigung vorgenommen (**Abb.4.18 C**).

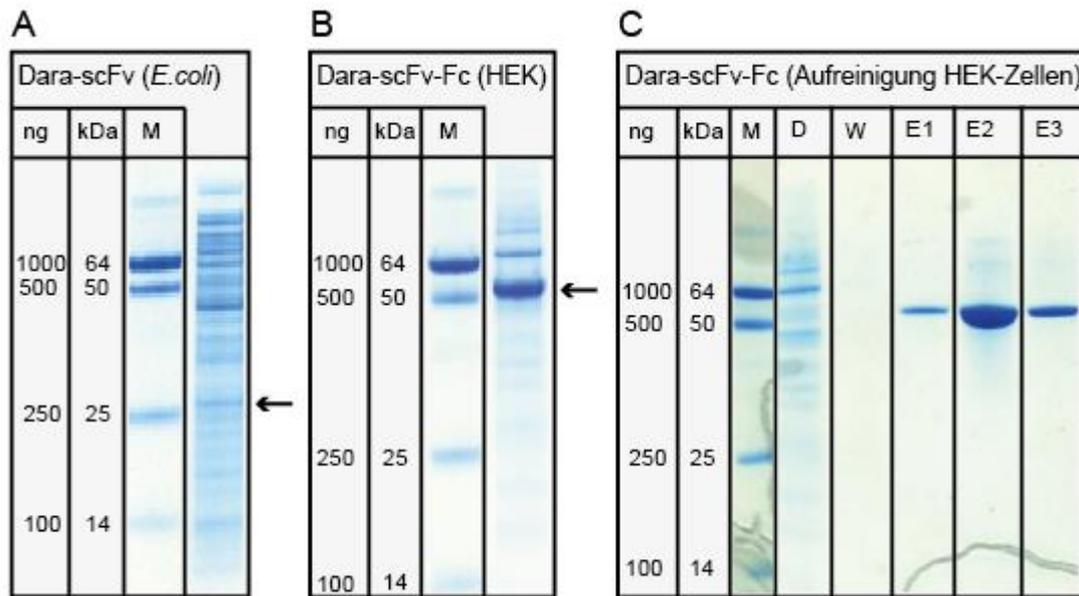


Abb. 4.18: Vergleichende Analyse der Expimierbarkeit von (A) Dara-scFv in *E.coli*, (B) Dara-scFv-Fc-Fusionsprotein in HEK293-6E-Zellen und (C) des Aufreinigungsprozesses mit Protein G. (A) Zur Produktion der Dara-scFv in *E.coli* wurde der Stamm HB2151 durch Hitzeschock transformiert. Die Expression der VHHS wurde durch Zugabe von 5 μ l IPTG (1 mM) induziert, die Bakterien wurden mittels Zentrifugation geerntet (15 min, 4.000 rpm, 4 $^{\circ}$ C), in 200 μ l PPL-Puffer I aufgenommen, für 30 Minuten auf Eis lysiert, zentrifugiert (5 min, 13.000 rpm, 4 $^{\circ}$ C) und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde nochmals für 30 Minuten mit 200 μ l PPL-Puffer II auf Eis lysiert, zentrifugiert und die Überstände gepoolt. Auf das Gel wurden 10 μ l aufgetragen. Zu sehen sind mehrere durch bakterielle Verunreinigungen entstandene Banden, Dara-scFv mit einer Größe von 25-30 kDa ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Durch den Vergleich mit dem Markerprotein (M) kann die Ausbeute auf eine Konzentration von ca. 15 ng/ μ l geschätzt werden. **(B)** Dara-scFv-Fc-Fusionsprotein im Zellüberstand von HEK293-6E-Zellen, die transient transfiziert und sechs Tage in serumfreiem Medium kultiviert wurden. Für die SDS-PAGE wurden 10 μ l aufgetragen. Nach Reduktion der Disulfidbrücken zeigt sich mit einer Konzentration von 100 ng/ μ l als Bande bei ca. 50 kDa das scFv-Fc-Protein und ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Unter nichtreduzierenden Bedingungen bilden die Antikörper über Disulfidbrücken Moleküle mit doppelter molarer Masse. **(C)** Dara-scFv-Fc-Fusionsprotein in HEK293-6E-Zellüberständen wurde durch Protein-G-Säulen aufgereinigt. Die Elution in drei Fraktionen erfolgte mit Elutionspuffer (pH 2,7) und wurde mit Neutralisationspuffer (pH 9) neutralisiert. Proben der einzelnen Arbeitsschritte wurden auf ihren Proteingehalt kontrolliert, mit D ist der Durchfluss der Säulen, mit W die Waschung der Säulen und mit E sind die drei Eluate gekennzeichnet. 30 ml HEK293-6E-Zellüberstände ergaben Proteinmengen von 1-3 mg.

4.3.2 Epitopanalyse von Daratumumab

Das Epitop des humanen Antikörpers Daratumumab konnte auf zwei β -Faltblättern im C-terminalen Bereich lokalisiert werden (De Weers et al., 2011, **Abb. 1.9**). Basierend auf seiner Struktur als monoklonaler Antikörper bzw. scFv-Fc bestehen seine Antigen-spezifischen Domänen aus einer schweren und einer leichten Kette, die gegenüber einer VHH mit singulärer schwerer Kette ein größeres Epitop binden. Der Vergleich dieser Daten mit den Röntgenstrukturanalysen des humanen CD38 mit gebundenen VHHS zeigt, dass das wesentlich größere Epitop Daratumumabs sich teilweise mit Epitop 2 überlappt, während

Epitop 1 keine unmittelbare Verbindung aufweist (**Abb. 4.19 A**). Die Darstellung des humanen CD38 mit van der Waals Oberflächenstruktur zeigt zur Verdeutlichung an Epitop 1 die VHH L-19.2 in Hellblau und an Epitop 2 die VHH L-15.2 in Rosa an, während die zwei β -Faltblätter des Daratumumab-Epitops in Dunkelblau und Grün gekennzeichnet sind.

Im Folgenden wurden Blockade-Analysen mit Dara-scFv, das mit 25-30 kDa nur aus den variablen Domänen der schweren und leichten Kette besteht, und den Detektions-VHHs L-15.1, L-15.2 und L-19.2 sowie Blockade-Analysen mit dem Dara-scFv-Fc-Fusionsprotein und den VHHs L-9.1, L-8 und L-15.4 durchgeführt (**Abb. 4.19 C**). Der Größenunterschied dieser beiden Konstrukte wird schematisch in **Abb. 4.19 B** verdeutlicht.

Bei der Detektion durch die VHH L-15.1 zeigt die Blockade durch Dara-scFv eine MFI von 12 % des Wertes, der ohne blockierende VHHs ermittelt wurde. Verglichen mit der Selbst-Blockade durch L-15.1, die eine MFI von 9 % ergab, bestätigt diese Analyse, dass Dara-scFv das Epitop 2 weitgehend blockiert. Ähnlich sind die Ergebnisse der Detektion durch die VHH L-15.2, bei der nach Blockade durch Dara-scFv ein MFI-Wert von 18 % ermittelt wurde.

Bezüglich des Epitops 1, an welchem VHH L-19.2 bindet, kann auch nach Blockade durch Dara-scFv eine MFI von 77 % detektiert werden, sodass von einer weitgehend ungehinderten Bindung der Detektions-VHH an Epitop 1 ausgegangen werden kann.

Die Detektion durch die VHH L-8 und VHH L-15.4, die ein bisher noch nicht näher lokalisiertes Epitop erkennen, zeigt mit 30 % und 23 % eine Blockade der Detektions-VHH und damit des Fluoreszenzsignals auf. Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Blockade-Analysen der übrigen VHHs ein Hinweis auf die räumliche Nähe bzw. Überschneidung der Epitope. Dass auch die an Epitop 1 bindende Detektions-VHH L-9.1 blockiert wird, kann auf den Einfluss der Größenverhältnisse des verwendeten Dara-Proteins verweisen, sodass eine blockierte oder partiell blockierte Bindung nur bedingt auf eine tatsächliche Überlappung der Epitope zurückzuführen ist.

Bei der Detektion durch die VHH L-9.1, VHH L-8 und VHH L-15.4 wurde das Dara-scFv-Fc-Fusionsprotein verwendet, das unter nicht reduzierenden Bedingungen eine molare Masse von mehr als 100 kDa aufweist, während das Dara-scFv-Protein nur eine Masse von 25-30 kDa besitzt. Die prozentualen Werte bei allen drei Detektionen mit dem Dara-scFv-Fc-Fusionsprotein liegen im unteren Drittel, mit 32 % bei L-9.1, 30 % bei L-8 und 23 % bei L-15.4.

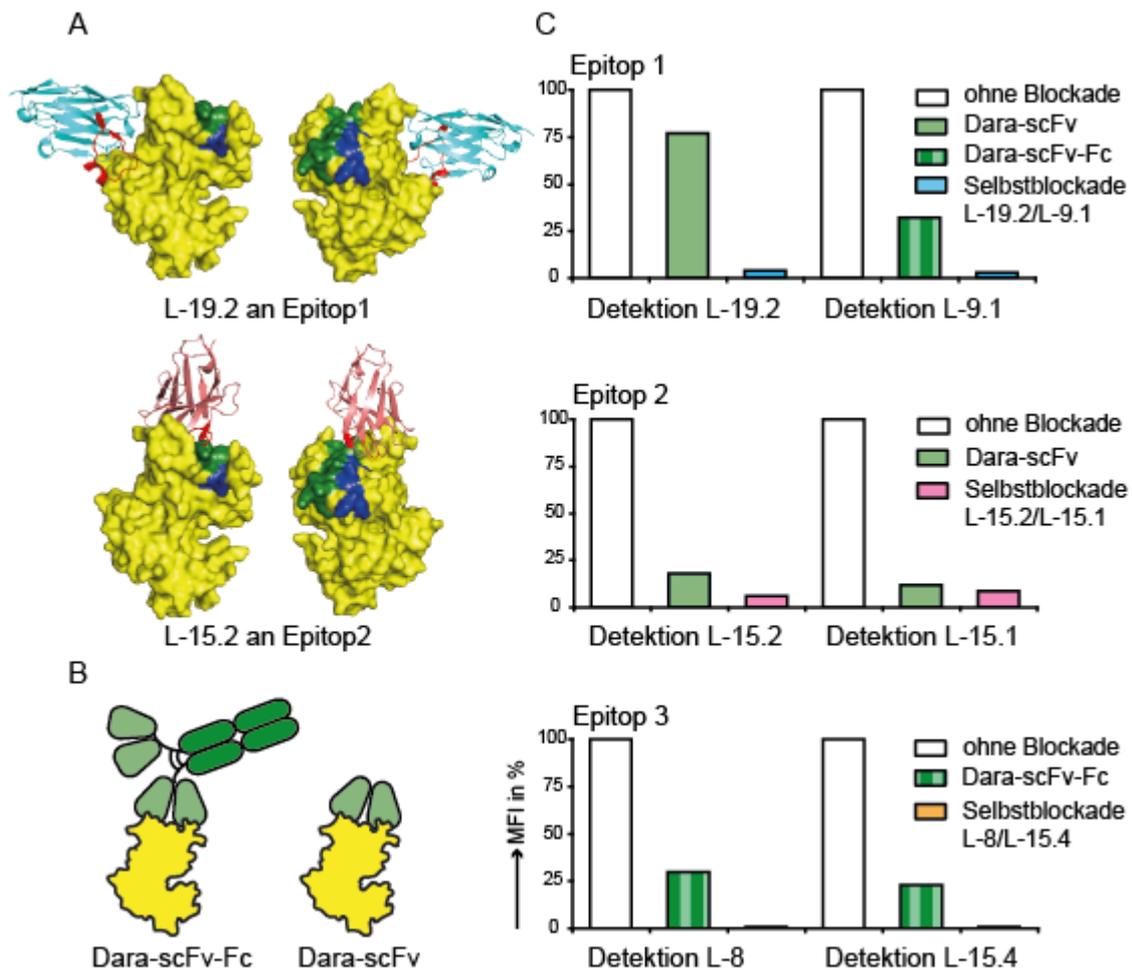


Abb. 4.19: (A) Epitop von Daratumumab. Van der Waals Oberfläche von hCD38. Das Epitop Daratumumabs befindet sich auf zwei β -Faltblättern (grün und dunkelblau) im C-terminalen Bereich. VHHs, die zwei bisher bekannte Epitope besetzen, sind als Cartoon dargestellt, an Epitop 1 bindet L-19.2 in Hellblau und an Epitop 2 bindet L-15.2 in Rosa. **(B) Dara-scFv und Dara-scFv-Fc in schematischer Darstellung.** **(C) Fluoreszenzsignale nach Blockade der Detektions-VHHs L-19.2, L-9.1, L-15.2, L-15.1, L-8 und L-15.4 durch Dara-scFv, bzw. Dara-scFv-Fc.** Nach Inkubation von stabil hCD38-transfizierten YAC-Zellen mit einem hohen Überschuss von Dara-scFv oder Dara-scFv-Fc wurden die Detektions-VHHs zugegeben. Ausgehend von den MFI-Werten ohne Blockade sind die prozentualen MFI-Werte nach Blockade mit Dara-Proteinen und Selbst-Blockade abgebildet. Bei der Detektion durch die VHH L-9.1, VHH L-8 und VHH L-15.4 wurde das Dara-scFv-Fc-Fusionsprotein verwendet, das unter nicht reduzierenden Bedingungen eine molare Masse von mehr als 100 kDa aufweist, während das Dara-scFv-Protein nur eine Masse von 25-30 kDa besitzt.

4.3.3 CDC-Aktivität der selektierten VHHs und des scFv-Fc Fusionsproteins

Da insbesondere die CDC-basierte Fähigkeit zur Lyse von CD38-positiven Zellen den Antikörper Daratumumab für die therapeutische Verwendung prädestiniert, wurde im folgenden die CDC-Aktivität der VHH-Fc-Fusionsproteine und des Dara-scFv-Fc analysiert.

Zu diesem Zweck wurden humane und murine Lymphom-Zelllinien mit einer VHH-Fc oder dem Dara-scFv-Fc und anschließend mit humanem Serum inkubiert. Es folgte das Anfärben mit Fluorochrom-konjugiertem Annexin V und unmittelbar vor der durchflusszytometrischen Analyse die Färbung mit Propidiumiodid. Die Doppelfärbung dient zur Feststellung der Zellviabilität und ermöglicht die Differenzierung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen, die sich wie **Abb. 4.20** schematisch zeigt, durch die Integrität und Permeabilität der Plasmamembran der Zelle unterschiedlich darstellen. Während die Nekrose als ein ungeordneter, passiver Prozess abläuft, der zur Schwellung und Desintegration der Zelle mit nachfolgender Inflammation führt, wird bei der Apoptose der Zelltod durch die betreffende Zelle als Teil ihres Stoffwechsels aktiv und kontrolliert durchgeführt, um Nachbargewebe nicht zu schädigen. Um apoptotische Zellen im Durchflusszytometer kenntlich zu machen, wird die im Rahmen der Apoptose stattfindende Translokation von Phosphatidylserin von der Innenseite auf die Außenseite der Membran genutzt, indem eine Färbung mit Fluorochrom-markiertem Annexin V vorgenommen wird, welches calciumabhängig an Phosphatidylserin bindet. Da Annexin V auch an nekrotischen Zellen binden kann, indem es die durchlässig gewordene Zellmembran durchquert, wird zusätzlich der DNA-Farbstoff Propidiumiodid verwendet, welcher ausschließlich nekrotische Zellen markiert. Daher zeigen sich lebende Zellen durchflusszytometrisch Annexin-V- und Propidiumiodid-negativ (AV-/PI-), früh apoptotische Zellen Annexin-V-positiv und Propidiumiodid-negativ (AV+/PI-), und nekrotische Zellen weisen beide Färbungen auf (AV+/PI+). Zellen, die Propidiumiodid-positiv und Annexin-V-negativ (AV-/PI+) sind, werden ebenfalls zu den nekrotischen Zellen gezählt.

Während die ADCC durch die Aktivierung von Caspasen die Apoptose der Zielzelle auslöst, sodass diese von Makrophagen, dendritischen oder neutrophilen Zellen phagozytiert werden, resultiert aus der CDC eine Desintegrität der Zellmembran und damit ein Zelltod nekrotischer Ausprägung.

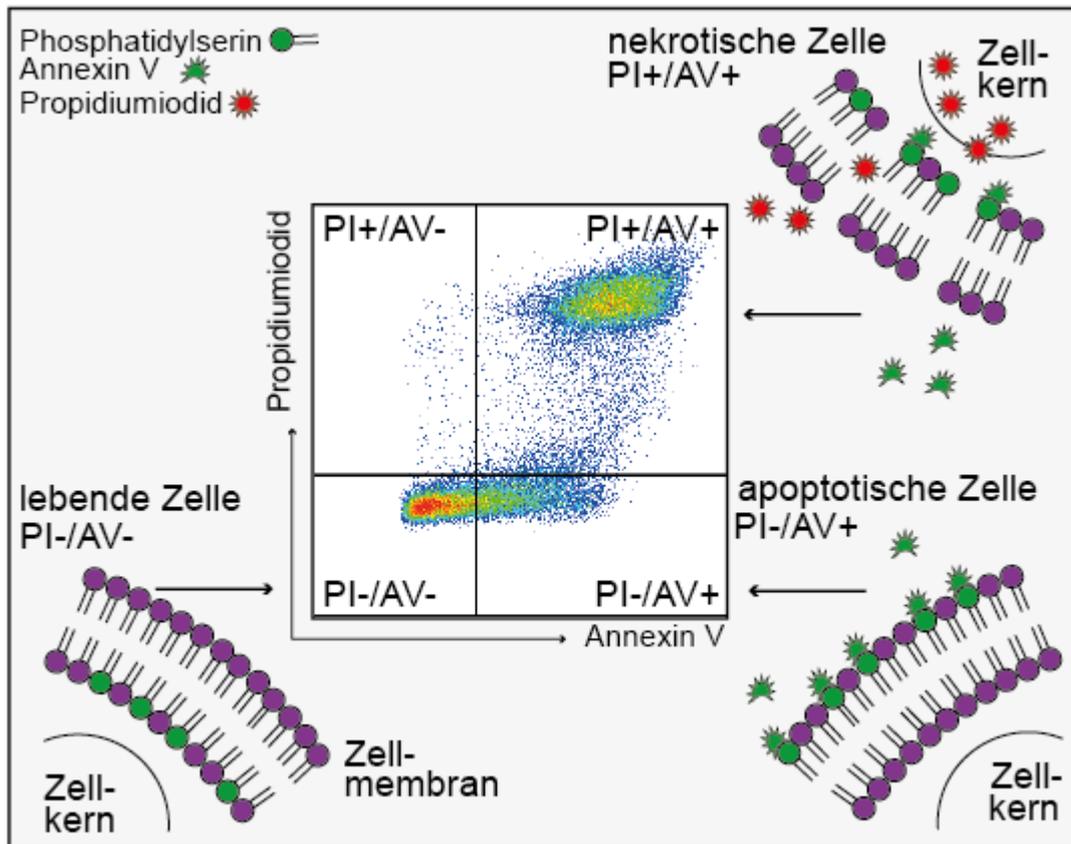


Abb. 4.20: Schematische Darstellung der Propidiumiodid-/Annexin-V-Färbung zur Differenzierung lebender, apoptotischer und nekrotischer Zellen. Der Zelltod durch die Mechanismen Apoptose und Nekrose zeichnet sich durch Unterschiede bezüglich der Permeabilität der Zellmembran aus. Zur Detektion apoptotischer Zellen kann eine Färbung mit Fluorochrom-konjugiertem Annexin V (AV) vorgenommen werden. Bei lebenden Zellen befindet sich die Membrankomponente Phosphatidylserin auf der Innenseite der Membran. Im Zuge der Apoptose erfolgt die Translokation auf die Außenseite, wo Phosphatidylserin calciumabhängig von AV gebunden werden kann. Propidiumiodid (PI) ist ein DNA-Farbstoff, der nur nekrotische oder spätapoptotische Zellen anfärbt, deren Membran ihre Integrität schon eingebüßt hat, wodurch nekrotische Zellen innerhalb der Gruppe der nicht viablen Zellen differenziert werden können. In der Mitte gezeigt ist die durchflusszytometrische Analyse von Zellen als Streudiagramm, wobei als Y-Achse die Propidiumiodid- und als X-Achse die Annexin-V-Färbung gegeneinander aufgetragen sind. Im unteren linken Quadranten zeigen sich die lebenden Zellen ohne Anfärbung mit Annexin V und Propidiumiodid (AV-/PI-), apoptotische Zellen sind unten rechts als Annexin-V-positiv (AV+/PI-) und nekrotische Zellen als Propidiumiodid-positiv (AV+/PI+) bzw. (AV-/PI+) zu sehen.

Die Auslösung der CDC durch VHH-Fc-Familien in Anwesenheit humanen Serums wurde zunächst an murinen YACHCD38-Zellen getestet, indem diese mit einer VHH-Fc bzw. dem Dara-scFv-Fc inkubiert wurden. Die Auslösung des Zelltodes wurde durch die Zugabe von humanem Serum induziert. Das humane Serum wurde vor den Experimenten von mehreren Spendern frisch gewonnen, gepoolt und abzentrifugiert, sodass nur die nicht zellulären Bestandteile des Blutes, wie Elektrolyte, Plasmaproteine, Hormone, Nährstoffe, Antikörper, sowie die Bestandteile des Komplementsystems enthalten sind.

Da erste Versuche auch in Kontrollen ohne VHHs oder mit nicht bindenden VHH-Fc-Proteinen eine beträchtliche Dezimierung lebender Zellen auslösten, die auf eine VHH-unabhängige Interaktion der Zellen mit Bestandteilen des humanen Serums hinweisen, wurde zunächst die Auswirkung variierender Dosen von humanem Serum auf murine und humane Lymphomzelllinien analysiert. **Abb. 4.21A** zeigt, dass die humanen Lymphomzellen der CA46-Linie durch die Veränderung der Serum-Dosis keine gesteigerte Zytotoxizität erfahren. Bei der Zugabe von 0,1 μ l Serum sind 5 % apoptotisch (AV+/PI-). Bei 1 μ l Serum zeigt sich mit ebenfalls 5 % und bei 10 μ l Serum mit 6 % keine wesentliche Veränderung. Der nekrotische Anteil verändert sich in der Summe der beiden einbezogenen Populationen (AV+/PI+ und AV-/PI+) von 5 % mit 0,1 μ l Serum auf 8 % mit 1 μ l und 7 % mit 10 μ l Serum. In Gegenwart des Dara-scFv-Fcs liegt der Anteil der apoptotischen Zellen mit 0,1 μ l Serum bei 27 % und mit 10 μ l Serum bei 31 %, der Anteil der nekrotischen Zellpopulationen (AV+/PI+ und AV-/PI+) liegt bei 14 %, 19 % und 17 %. Der prozentuale Anteil der apoptotischen Zellen überwiegt gegenüber den nekrotischen Zellen, obwohl CDC zur Zelllyse führt. Für den monoklonalen Antikörper Daratumumab wird neben seinem bedeutenderen Potenzial als Induktor von CDC und ADCC ebenfalls die direkte Auslösung der Apoptose berichtet, jedoch nur durch FcR-vermittelte, sekundäre Kreuzvernetzung mit zugefügten Effektorzellen, die bei fehlender ADCC-Aktivität den Fc γ -Rezeptor I exprimieren (Phipps et al., 2015; Jansen et al., 2012), sodass der große Anteil apoptotischer Zellen aus einer, verglichen mit dem Propidiumiodid, dominanteren Invasion des Annexin V in die lysierte Zelle herrühren könnte. Humane RPMI-Zellen wiesen bei Zugabe von 10 μ l humanem Serum 77 % lebende Zellen auf. Die Zugabe von Dara-scFv-Fc zeigte ebenfalls einen Anteil von 79 % (Daten nicht gezeigt).

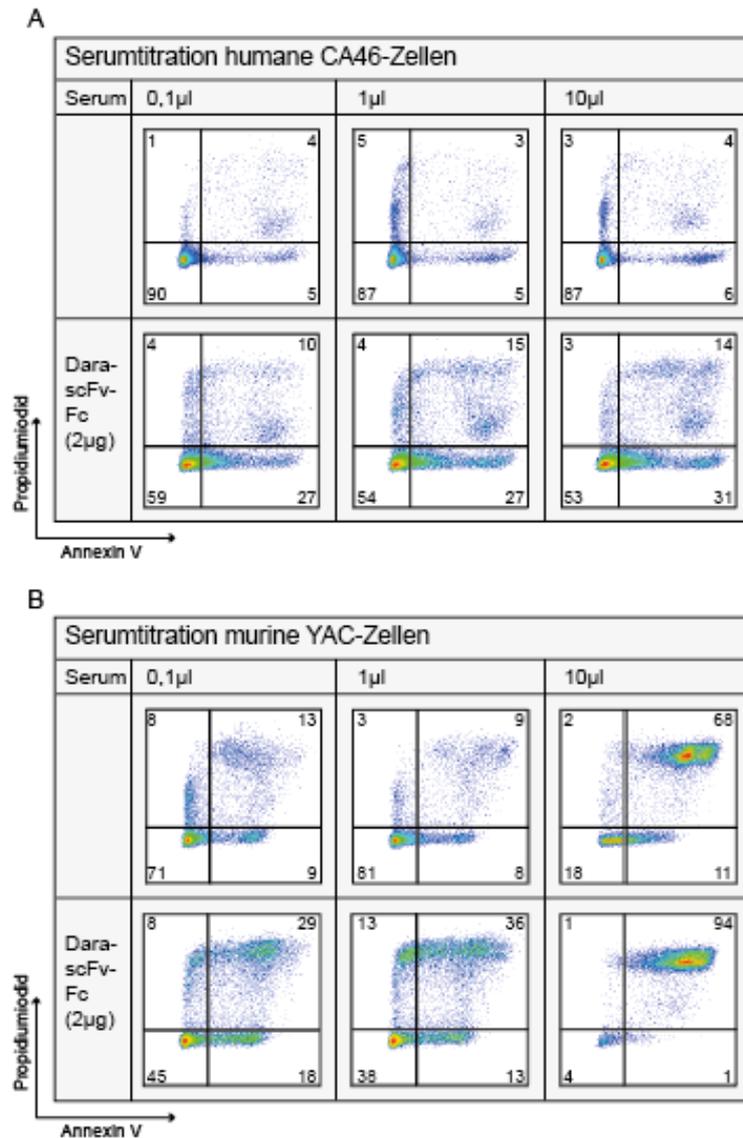


Abb. 4.21: Auswirkung verschiedener Dosen von humanem Serum im CDC-Assay. Verwendet wurden pro Ansatz 1×10^6 murine, stabil hCD38-transfizierte YAC-, bzw. humane CA46-Zellen. Ein Teil der Ansätze wurde mit 2 µg Dara-scFv-Fc für zehn Minuten vorinkubiert. Anschließend erfolgte eine einstündige Inkubation mit 0,1 µl, 1 µl oder 10 µl humanen Serums bei 37 °C. Die Proben wurden mit Annexin-V-Bindepuffer gewaschen und mit Fluorochrom-konjugiertem AV gefärbt und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. PI wurde unmittelbar vor der durchflusszytometrischen Messung zugegeben. Lebende Zellen sind Annexin V und Propidiumiodid negativ (AV-/PI-), früh apoptotische Zellen Annexin V positiv und Propidiumiodid negativ (AV+/PI-) und nekrotische Zellen sind Propidiumiodid positiv (AV+/PI+) bzw. (AV-/PI+). Als Kontrolle diente die Inkubation mit einem nicht bindenden VHH-Fc-Fusionsprotein und humanem Serum. **(A) Serumtitration an humanen CA46-Zellen. (B) Serumtitration an murinen YAC-Zellen.** In der unteren Reihe sind die Ergebnisse nach Inkubation mit Dara-scFv-Fc und Serum zu sehen, oben die nur mit Serum inkubierten Zellen.

Murine Zellen sind auch in Abwesenheit von Antikörpern wesentlich anfälliger für die zytotoxische Wirkung humanen Serums. Ursache kann die Antikörper-unabhängige Initiierung der Komplementkaskade über den alternativen Weg oder die Existenz von Antikörpern gegen Membranbestandteile der xenologen Zellen im humanen Serum sein. Der Anteil der lebenden Zellen (AV-/PI-) liegt bei isolierter Zugabe von 0,1 µl Serum bei 71 % und

mit 1 μ l bei 81 %. Ein starker Abfall kann jedoch unter Zugabe von 10 μ l beobachtet werden, die den Anteil auf 18 % reduziert. Die Kombination von 2 μ g Dara-scFv-Fc mit 0,1 μ l Serum senkt den Anteil lebender Zellen auf 45 %, mit 10 μ l Serum überleben nur 4 % der Zellen (**Abb. 4.21B**). Die murine Lymphom-Zelllinie DC27.10hCD38 reagiert in Anwesenheit von 0,1 μ l Serum mit einem Anteil von 86 % lebenden Zellen, bei 1 μ l Serum mit 89 % und bei 10 μ l Serum mit einem Anteil von 46,5 %. In Anwesenheit von 2 μ g Dara-scFv-Fc sinkt der Anteil lebender Zellen von 68 % mit 10 μ l humanem Serum über 43 % mit 1 μ l auf 9 % mit 0,1 μ l Serum (Daten nicht gezeigt).

Um die Wechselwirkungen des humanen Serums mit murinen YAcCD38-Zellen gering zu halten, wurde der Einsatz von 1 μ l Serum gewählt, da diese Dosis mit 81 % lebenden Zellen ohne Dara-scFv-Fc und einer Dezimierung auf 38 % bei Zugabe des scFv-Fc-Fusionsproteins die größte Differenz zeigt. Im folgenden Versuch wurde die Auswirkung unterschiedlicher Konzentrationen von VHH-Fcs und dem Dara-scFv-Fc auf murine YAcCD38 Zellen unter Zugabe von 1 μ l humanem Serum getestet. **Abb. 4.22** zeigt, dass alle getesteten VHH-Familien und der Dara-scFv-Fc in Verbindung mit 1 μ l humanem Serum eine zytotoxische Wirkung auf murine YAcCD38-Zellen haben, die durch die Mechanismen der CDC zu erklären ist. Verwendet wurden VHH-Fc-Konzentrationen von 2 μ g, 200 ng und 20 ng. Die stärkste Zytotoxizität weist dabei Dara-scFv-Fc auf. Bei 2 μ g konnte der Anteil der Annexin-V- und Propidiumiodid-negativen Zellen auf 18 % reduziert werden, bei 20 ng auf 51 %. Durch den Kontroll-VHH-Fc wurde in Verbindung mit dem Serum eine maximale Reduktion der lebenden Zellen auf 77 % erzielt.

Ergebnisse

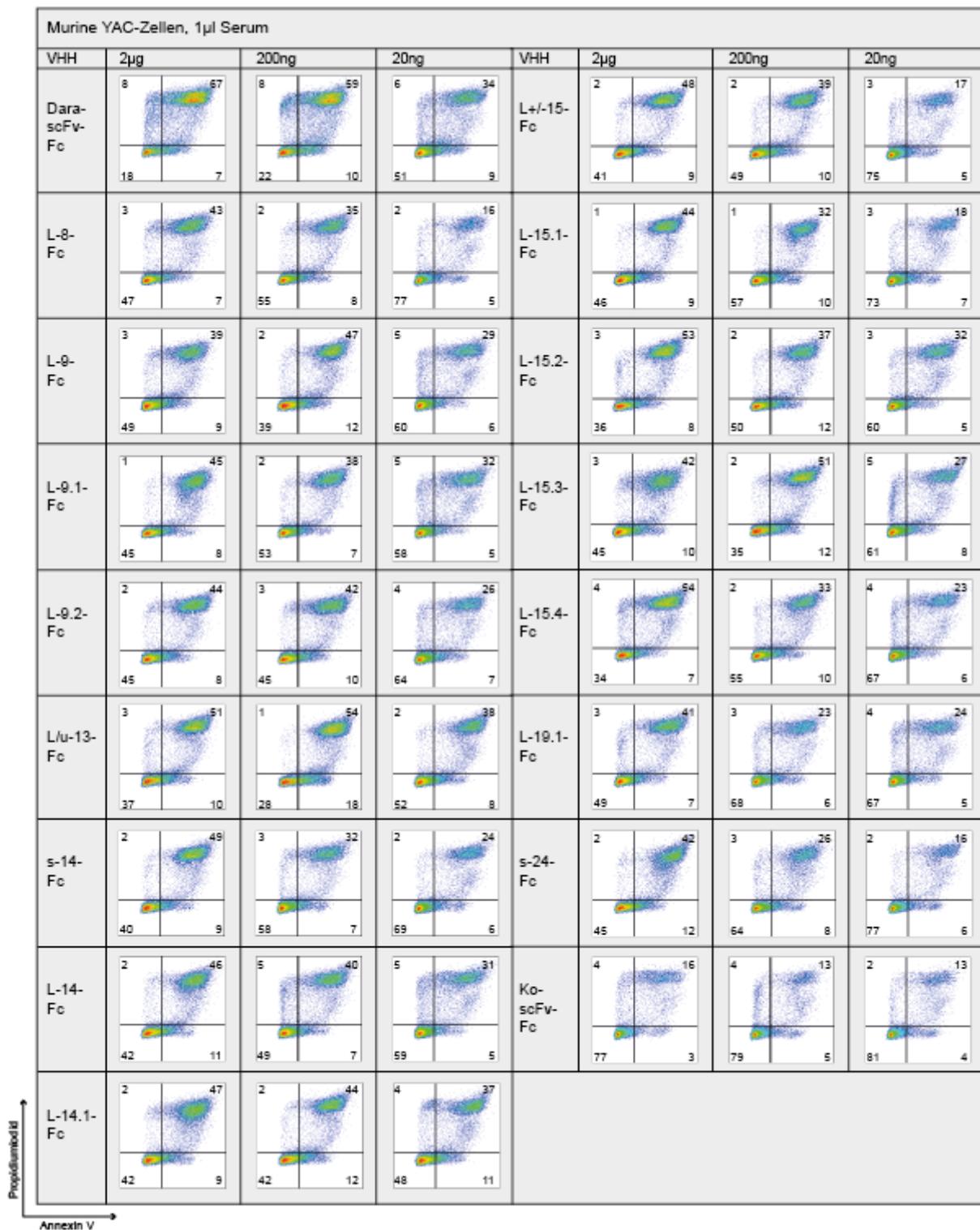


Abb. 4.22: Auswirkungen verschiedener VHH-Fc- und Dara-scFv-Fc-Konzentrationen im CDC-Assay mit murinen YAC-Zellen und 1 µl Serum. Verwendet wurden pro Ansatz $0,5 \times 10^6$ murine, stabil hCD38-transfizierte YAC-Zellen, die zunächst für zehn Minuten mit 2 µg, 200 ng oder 20 ng einer VHH-Fc oder Dara-scFv-Fc und anschließend bei 37 °C für 1 Stunde mit 1 µl humanem Serum inkubiert wurden. Die Behandlung mit AV und PI, die durchflusszytometrische Analyse sowie die Darstellung in Streudiagrammen erfolgten unverändert zu den Vorversuchen. Als Kontrolle diente ein nicht bindendes scFv-Fc-Fusionsprotein.

Die zytotoxische Wirkung der VHH-Fc-Familien zeigt in fast allen Fällen eine verstärkte Reduktion der lebenden Zellen bei zunehmender VHH-Konzentration. Bei den VHH-Fc-Familien L-9, L/u-13 und L-15.3 konnte bei der mittleren Konzentration von 200 ng VHHs die stärkste Wirkung festgestellt werden. Nach Dara-scFv-Fc zeigte L/u-13 die stärkste Wirkung mit einer Reduktion der lebenden Zellen auf 28 %. VHH-Fc L-9 dezimierte diese Zellpopulation auf 39 %. Eine Häufung stärkerer CDC-Wirkung findet sich bei den VHH-Familien, deren CDR3 eine Länge von 15 Aminosäureresten hat. Bei L-15.2 ergibt sich ein Anteil der AV/PI-negativen Zellen von 36 %, bei L-15.3 ein Anteil von 34 % und bei L-15.4 von 35 %. Bei der geringsten Konzentration der VHH-Fc-Familien von 20 ng erzielte L-14.1 mit einem Anteil von 48 % lebenden Zellen die stärkste Wirkung, neben L/u-13 mit 52 %. Bei Dara-scFv-Fc lag der Anteil der lebenden Zellen bei 51 %.

Bei humanen CA46- und Daudi-Zellen wurde nach den Ergebnissen der Serumtitration (**Abb. 4.21A**) eine Serumzugabe von 10 µl gewählt. Bei humanen Daudi-Zellen konnten 20 ng Dara-scFv-Fc eine Reduktion der lebenden Zellen auf 55 % bewirken, bei 200 ng sank der Anteil auf 41 % und bei 2 µg auf 25 %. Demgegenüber fiel die Wirkung der VHH-Fcs weniger stark aus. **Abb. 4.23A** zeigt die Ergebnisse daher nur exemplarisch für s-24 mit 59 % lebenden Zellen bei einer Zugabe von 2 µg. Die nicht gezeigten VHH-Fcs L/u-13 und L-15.4 reduzierten die Population der lebenden Zellen auf 65 %, L-14 auf 62 %, während alle anderen VHH-Fcs eine noch geringere Reduktion bewirkten. Mit CA46-Zellen (**Abb. 4.23B**) konnte Dara-scFv-Fc in diesem Versuchsaufbau eine CDC-Wirkung erzielen, die den Anteil lebender Zellen auf 54 % dezimierte. Durch Titration der VHH-Fcs ergab sich keine eindeutige zytotoxische Wirkung, exemplarisch gezeigt ist die VHH-Fc L-14.1 mit einer Reduktion auf 83 % lebende Zellen. Dieser Wert zeigt keine signifikante Änderung zur ausschließlichen Serumgabe (88 %) oder der nicht bindenden Kontroll-scFv-Fc (87 %).

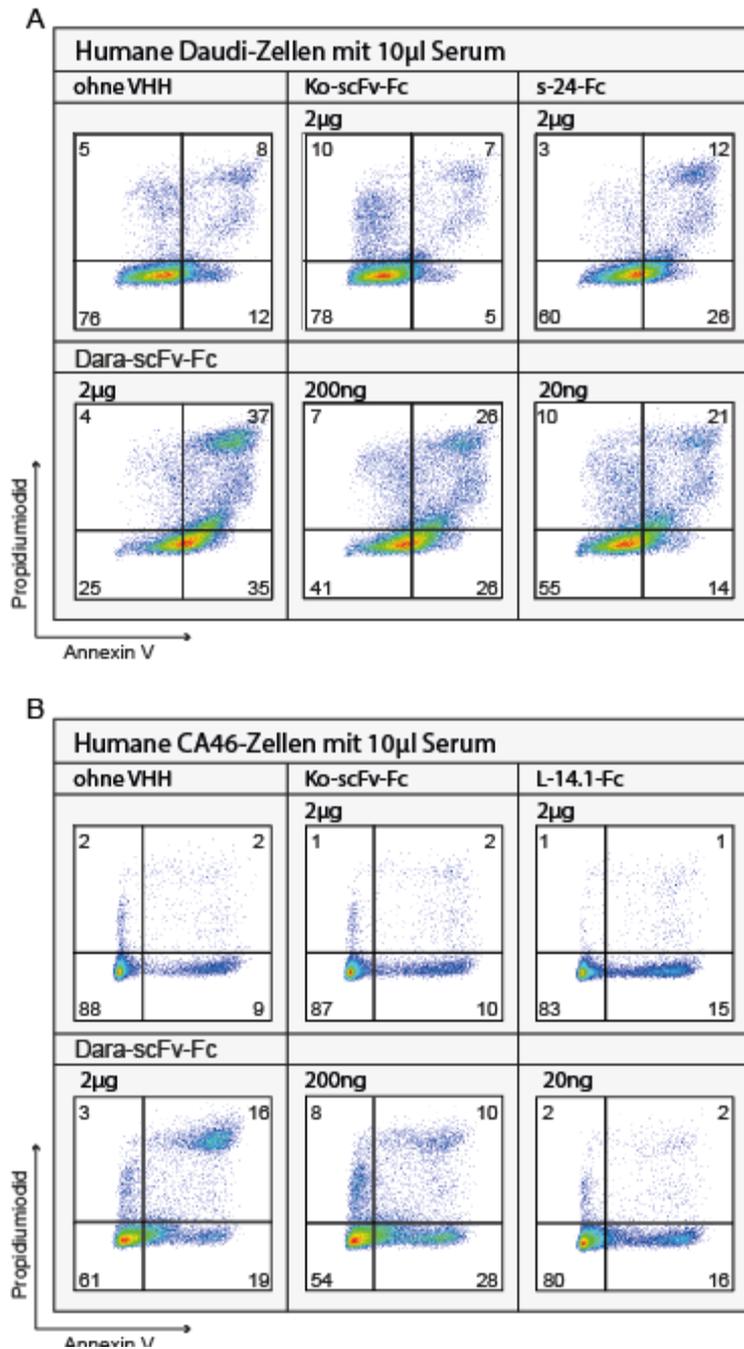


Abb. 4.23: Auswirkungen verschiedener VHH-Fc- und Dara-scFv-Fc-Konzentrationen im CDC-Assay mit humanen Zelllinien und 10 µl Serum. Verwendet wurden pro Ansatz $0,5 \times 10^6$ humane Daudi- oder CA46-Zellen, die zunächst für zehn Minuten mit 2 µg, 200 ng oder 20 ng einer VHH-Fc oder Dara-scFv-Fc und anschließend bei 37 °C für eine Stunde mit 10 µl humanem Serum inkubiert wurden. Die Behandlung mit AV und PI, die durchflusszytometrische Analyse sowie die Darstellung in Streudiagrammen erfolgten unverändert zu Vorversuchen. Als Kontrolle diente ein nicht bindendes scFv-Fc-Fusionsprotein. **(A)** CDC-Assay mit humanen Daudi-Zellen. **(B)** CDC-Assay mit humanen CA46-Zellen. In der unteren Reihe sind die Ergebnisse nach Inkubation mit Dara-scFv-Fc und Serum zu sehen, oben links ist die ausschließliche Zugabe von Serum, in der Mitte mit der zusätzlichen Inkubation mit der Kontroll-scFv-Fc und rechts oben sind exemplarisch für die anderen getesteten VHH-Fc-Fusionsproteine die Auswirkungen von 2 µg der VHH-Fc s-24 bzw. L-14.1 gezeigt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die aus Lama 10, 25, 538 und 539 selektierten, in ein Fc-Format umklonierten und an drei unterschiedlichen Epitopen bindenden VHHs sowie das synthetisierte Dara-scFv-Fc-Fusionsprotein in vitro die Potenz zur Auslösung der CDC an murinen Zelllinien besitzen. Die Ergebnisse mit humanen Zelllinien, insbesondere Daudi-Zellen, zeigen, dass eine Eskalation der Dosen von Serum und VHH-Fcs der nächste Schritt sein könnte, um die CDC-Wirkung der VHH-Fc-Fusionsproteine zu intensivieren und weiterhin zu untersuchen, um künftig die Vorteile, die Einzeldomänen-Antikörper bieten, auch für die therapeutische Induktion der CDC zu nutzen.

5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Selektion von VHHs mit Spezifität für das als Enzym und Rezeptor fungierende humane CD38 sowie ihre Analyse unter Einbezug ihres zytotoxischen Potenzials im Hinblick auf zukünftige diagnostische und therapeutische Anwendungen im Bereich CD38-assoziiierter B-Zellerkrankungen wie der chronisch lymphatischen Leukämie und des multiplen Myeloms. In diesem Rahmen konnte neben der Charakterisierung der VHHs bezüglich der Parameter CDR3-Länge, Affinität und Epitop gezeigt werden, dass mittels Umklonierung erzeugte Fc-Fusionsproteine durch den Mechanismus der CDC eine zytotoxische Wirkung auf murine Zelllinien haben. **Abb. 5.1** zeigt die ermittelten Eigenschaften der selektierten VHHs in einer Übersicht. Die nachfolgend diskutierten Punkte betreffen Kriterien der Immunisierung und der Produktion, mögliche Einflussfaktoren auf die Affinität sowie weiterführende Ansätze, die sich aus der Charakterisierung bezüglich des Epitops und des Potenzials zur CDC ergeben.

Familie	Lama	CDR3	K_D [nM]	Epitop
L-8	539	DHTFAGVY	3	3
L-9	25	ASTAVGADT	9	2
L-9.1	538	WHYAAGRDY	30	1
L-9.2	539	GNPGTRYIY	7	2
L/u-13	539	GLKRIGDQREADY	4	2/3
s-14	10	DRFVVAAGTHLDY	31	2
L-14	538	DRFTLVPTTSDLDY	53	2
L-14.1	539	RFWIGVRAPAEYNY	4	2
L+/-15	10	TTSVVVLLAPNWYEY	115	2
L-15.1	25	DRLVLVALSIADPGF	8	2
L-15.2	25	GFPVLVALSIADPDY	6	2
L-15.3	10	GRGIVAGRIPAAYAD	4	2
L-15.4	539	GRTASASTMIREYDS	32	3
L-19.1	25	QYQDRYYDEFTWKEKMDY	7	1
s-24	10	DVTLNPFPTGWDTRSGPMYRYEYDY	22	3

Abb. 5.1: Übersicht der Charakteristika der selektierten VHH-Familien. Geordnet sind die hCD38-spezifischen VHHs bzw. VHH-Fc-Fusionsproteine nach der Länge ihrer CDR3, wobei die innerhalb einer Familie variierenden Aminosäuren rot gekennzeichnet sind. Der K_D -Wert bezeichnet die ermittelte Dissoziationskonstante der VHH zu ihrem Antigen. Die Nummerierung der Epitope erfolgte willkürlich. Durch Röntgenstrukturanalyse ist die Lage von Epitop 1 und 2 mittels Kokristallisation einzelner VHHs bereits bekannt. Für die anderen VHHs wurde durch Blockadeversuche auf die Epitope geschlossen.

5.1 Auswirkung der Immunisierungsstrategien

Die Induktion der Bildung von anti-CD38-Schwereketten-Antikörpern wurde für vier Lamas nach unterschiedlichen Schemata realisiert. Die Lamas 10 und 25 wurden mit rekombinant hergestelltem, deglykosyliertem, humanem CD38 aus Insektenzellen behandelt (Unger, 2012), die Lamas 538 und 539 erhielten mittels Genpistole Gold-gekoppelte Plasmid-DNA von humanem und murinem CD38 und im weiteren Verlauf glykosylierte Proteine, Lama 539 wurde zusätzlich mit humanem und murinem P2X4 immunisiert. Die CD38-spezifischen VHH-Phagenbibliotheken wurden für die Lamas 10 und 25 mithilfe eines Festphasenpannings

und eines dreimalig wiederholten Pannings mit stabil transfizierten NIH-3T3-Zellen angereichert und VHH-Familien selektiert (Unger, 2012), für die Lamas 538 und 539 erfolgte die Isolierung der VHH-Familien bereits nach einmaligem Panning mit einer CD38 hoch positiven Lymphomzelllinie.

Aus Lama 10 konnten fünf hCD38-spezifische VHH-Familien (s-14; L-15.3; L+/-15; s-24; nicht in dieser Arbeit behandelt: L+13) selektiert werden, von denen sich eine VHH-Familie (L-15.3) als hochaffin mit einer Dissoziationskonstante <10 nM erwies, die Selektion der VHH-Bibliothek von Lama 25 ergab fünf hCD38-spezifische VHH-Familien (L-9; L-15.1; L-15.2; L-19.1; nicht in dieser Arbeit behandelt: L-19.2), die sich alle als hochaffin auswiesen. Bei Lama 538 zeigten sich nach einmaligem Panning zwei hCD38-spezifische VHH-Familien (L-9.1; L-14) ohne hohe Affinität. Bezüglich des Lamas 539 erwiesen sich vier VHH-Familien (L-8; L-9.2; L/u-13; L-14.1) als hochaffin, selektiert wurde eine weitere Familie (L-15.4) mit einer niedrigen Affinität. Im Vergleich zeigt keine der Immunisierungsstrategien eine eindeutige Dominanz bezüglich der erzielten Ergebnisse. Insbesondere die Lamas 25 und 539, die gänzlich unterschiedlichen Immunisierungs- und Panningstrategien unterlagen, weisen eine große Ausbeute an hochaffin bindenden VHH-Familien auf, deren Dissoziationskonstanten im unteren nanomolaren Bereich von <10 liegen.

Immunisierung	Antigen		Panning	Lama	Binder	hohe Affinität
Protein	hCD38		FP + 3 x ZP	10	5	1
				25	5	5
Plasmid-DNA + Protein	mCD38 + hCD38	hP2X4 mP2X4	1 x ZP	538	2	0
				539	5	4

Abb. 5.2: Tabellarische Übersicht der Resultate der unterschiedlichen Immunisierungs- und Panningschemata. Aufgeschlüsselt sind die Immunisierungsstrategien bezüglich Vorgehen und verwendetem Antigen, die Strategie des Pannings beinhaltet das Festphasenpanning (FP) und das Zellpanning (ZP). Aufgeführt sind die selektierten Binder, sowie die Teilgruppe der hochaffinen, spezifischen VHHs, definiert durch einen KD-Wert kleiner als 10 nM.

5.2 Optimierte Produktion

Durch die Umklonierung in den Vektor pCSE2.5 konnten die Vorteile der serumfreien Produktion in HEK293-6E-Zellen genutzt werden. Bei der Expression durch *E.coli*-Bakterien erwies sich die Produktionsrate der VHHs als unbeständig, und mittels SDS-PAGE wurden Verunreinigungen und durch Degradation der tags entstandene Doppelbanden offensichtlich. Im Rahmen weitergehender Analysen dienen diese tags als Epitop Fluorochrom-konjugierter

Antikörper der Visualisierung im Durchflusszytometer, sodass VHHs ohne *tag* im Aufreinigungsprozess herausgefiltert werden müssen, wodurch die Ausbeute durch das *E.coli*-Expressionssystem reduziert wird. Mit der Expression durch das eukaryotische HEK293-6E-Expressionssystem konnte unter endotoxinfreien Bedingungen, in serumfreiem Medium die proteolytische Spaltung der VHHs umgangen werden. Das Produktionslevel wies wesentlich höhere Konstanz auf und erlaubte für VHHs mit c-Myc-6xHIS-*tag* durchschnittliche Produktionsraten von 100 µg/ml Zellkultur in Einzelfällen bis zu 300 µg/ml. Die Produktionsrate der mit Fc-Anteil fusionierten VHHs erreichte Mengen von 100-200 µg/ml. Für das scFv-Fc-Fusionsprotein Dara-Fc konnte ein Ertrag von 100 µg/ml erzielt werden, der sich mit Literaturangaben (Jäger, Schirmann et al., 2013), die bei 100-600 µg/ml liegen, deckt. Die Expression durch HEK293-6E-Zellen weist damit signifikant bessere Ergebnisse auf als die Produktion in *E.coli*.

5.3 Einflussfaktoren auf die Affinität

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Affinität der VHHs durch Titration analysiert und mit Bestimmung der Dissoziationskonstante K_D der Zusammenhang zwischen VHH-Konzentration und halbmaximaler Sättigung der Bindungsstellen einem interfamiliär vergleichbaren Konzentrationswert zugeordnet werden. Insgesamt neun VHHs (L-8, L-9, L-9.2, L/u-13, L-14.1, L-15.1, L-15.2, L-15.3, L-19.1) zeigten eine hohe Affinität mit K_D -Werten im nanomolaren Bereich von <10 . Die VHHs L-8, L-14.1 und L-15.3 wiesen Werte <5 auf.

Wie bereits in 5.1 erörtert, beeinflusst die Art der Immunisierung nicht die Affinität. Weiterhin konnte kein Einfluss auf die Affinität durch CDR3-Länge oder Epitopzugehörigkeit der VHHs erkannt werden. Die hochaffinen VHHs weisen CDR3-Längen von 8-19 Aminosäuren auf, und an jedem der drei identifizierten Epitope binden sowohl hoch- als auch niedrigaffine VHHs.

Auch die Häufigkeit, mit der ein Klon im Antigen-spezifischen Panning der Phagen-Display-Bibliothek isoliert wurde, korreliert nicht mit der Bindungsstärke, so wurden einerseits von den niedrigaffinen VHHs s-14 (13) und L+/-15 (8), aber auch von den hochaffinen VHHs L-15.2 (27), L-15.3 (9) und L-19.1 (9) eine hohe Anzahl identischer Klone isoliert.

Teilweise konnten im Antigen-spezifischen Panning Klone isoliert werden, deren CDR3-Sequenz bereits aus der Primärbibliothek bekannt war. Dies betrifft die VHH-Familien L-9.1 und L-12.1 aus Lama 538 sowie L-8 aus Lama 539. In der Primärbibliothek des Lamas 538 machen Klone der VHH-Familie L-9.1 einen Anteil von 10 % aus. Hiervon fanden sich vier Klone mit identischer CDR3-Sequenz, wie sie L-9.1a, b und c aufweisen. In der restlichen Sequenz zeigten sich gegenüber L-9.1a 5-8 und gegenüber L-9.1b 4-5 abweichende

Aminosäuren, L-9.1c wurde als identisches Isolat gefunden. Die Mitglieder der VHH-Familie L-9.1 unterscheiden sich in ihrer Spezifität und der Stabilität ihrer Bindung. VHH L-9.1a zeigt von den getesteten Familienmitgliedern das höchste Fluoreszenzsignal (**Abb. 5.3**), die festgestellte KD von 30 nM (**4.2.1**) verweist jedoch auf eine mittlere Affinität. VHH L-9.1c zeigt hingegen keine Spezifität für hCD38.

Innerhalb der VHH-Familie L-8 aus Lama 539 bestehen drei unterschiedliche CDR3-Sequenzen. Diese Familie ist mit 15 % Vorkommen am prominentesten in der Primärbibliothek des Lamas 539. Fünf dieser Klone zeigen die gleiche CDR3-Region wie L-8a, c und e. In der restlichen Sequenz finden sich gegenüber L-8a 2-13 und gegenüber L-8c 1-13 Differenzen, L-8e unterscheidet sich in 2-14 Aminosäuren. Ein Klon der Primärbibliothek zeigt die gleiche CDR3 wie L-8d mit 5 abweichenden Aminosäuren und L-8f mit 11 abweichenden Aminosäuren in der restlichen Sequenz. L-8a, c, d und e erwiesen sich als CD38-spezifisch und L-8a als hochaffin, während sich L-8f nicht als CD38-bindend herausstellte.

Als unspezifisch erwies sich die VHH L-12.1, die ebenfalls in identischer Form in der Primärbibliothek gefunden wurde. Insgesamt zeigt sich keine Korrelation zwischen Vorkommen in der Primärbibliothek und der Affinität einer VHH zu ihrem Zielantigen. Die kompletten Sequenzvergleiche sind im Anhang aufgeführt.

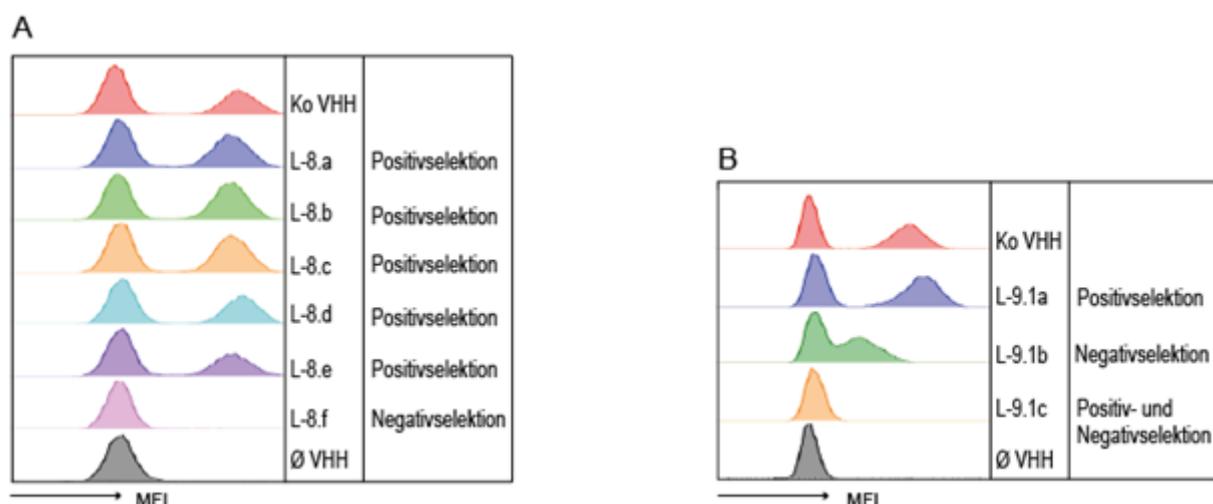


Abb. 5.3: Spezifität der Mitglieder der VHH-Familien L-8 und L-9.1 aus Positiv- und Negativselektion des Antigen-spezifischen Pannings. (A) VHH-Familie L-8. Jeweils $0,5 \times 10^6$ murine, untransfizierte und $0,5 \times 10^6$ hCD38-transfizierte YAC-Zellen wurden mit 50-200 ng VHHs aus Periplasmalysaten und 600 ng eines mit dem Fluorochrom FITC gekoppelten c-Myc-Antikörpers für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und zwei Waschschritten unterzogen, bevor die durchflusszytometrische Analyse erfolgte. **(B) VHH-Familie L-9.1.** Jeweils $0,5 \times 10^6$ murine, untransfizierte und $0,5 \times 10^6$ hCD38-transfizierte YAC-Zellen wurden mit 50-200 ng VHHs aus Periplasmalysaten inkubiert, dreimal gewaschen und anschließend mit 300 ng des c-Myc-Antikörpers versetzt. Jeweils oben ist die positive Kontroll-VHH und unten sind als negative Kontrollinstanz die nur mit den FITC-gekoppelten c-Myc-Antikörpern versetzten Zellpopulationen gezeigt.

Entscheidend beeinflusst wird die Affinität von Abweichungen weniger oder sogar einer einzigen Aminosäure in der Sequenz der VHH, wie **Abb. 5.3** anhand der VHH-Familien L-8 und L-9.1 zeigt, innerhalb derer bindende und nicht bindende Mitglieder zu finden sind. Die variierenden Mitglieder der VHH-Familien erklären sich durch die Affinitätsreifung der aktivierten B-Zellen im Zuge der somatischen Hypermutation. Familienmitglieder entstammen unterschiedlichen, aber miteinander verwandten B-Zellen und weisen eine graduell abgestufte Affinität auf. Da die Bindung von Antikörpern auf elektrostatischen Kräften, Van-der-Waals-Kräften, Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophoben Wechselwirkungen basiert, können sie von der Charakteristik einzelner Aminosäuren abhängen. Insofern kann durch gezielte Punktmutationen die Effektivität einer VHH optimiert werden (Inoue, Suganami et al., 2013).

Bei beiden VHH-Familien rekrutieren sich die Mitglieder außerdem sowohl aus der Positivselektion als auch aus der Negativselektion mit der humanen Myelomzelllinie U266, die in nur geringem Maße hCD38 exprimiert. Während L-8f aus der Negativselektion nicht spezifisch für hCD38 ist, zeigt bei VHH-Familie L-9.1 der Klon L-9.1a aus der Positivselektion das stärkste Fluoreszenzsignal. L-9.1b aus der Negativselektion zeigt ein geringeres und L-9.1c, identisch in Negativ- und Positivselektion gefunden, kein Fluoreszenzsignal.

5.4 Auswirkungen der Epitopzugehörigkeit

Durch Kreuzblockade-Experimente konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die selektierten VHH-Familien drei distinkten Epitopen (1, 2 und 3) sowie einem intermediärem Epitop (2/3) zugeordnet werden können.

Die VHH-Familien L-19.1 und L-9.1 zeigen sich dem durch Kokristallisation bekannten Epitop 1 am Übergang der N-terminalen zur C-terminalen Domäne zugehörig, die VHH-Familien L-9, L-9.2, s-14, L-14, L-14.1, L+/-15, L-15.1, L-15.2 und L-15.3 erkennen das C-terminal lokalisierte Epitop 2.

Die Familien L-8 und L-15.4, die beide dem Lama 539 entstammen, und die Familie s-24 des Lamas 10 binden das neue Epitop 3, dessen Lokalisation in der Nähe des Epitops 2 zu vermuten ist. Evidenz hierfür bietet die VHH-Familie L/u-13, repräsentiert durch Klon L-13a, die in Blockade-Analysen Auswirkungen auf Epitop 2 und auf Epitop 3 zeigt, sodass sie einer eigenen Gruppe zugeordnet wurde, deren Epitop zwischen dem bereits visualisierten Epitop 2 sowie Epitop 3 liegt. Auch die VHH-Familien L-9.2 und L-14, die Epitop 2 zugeordnet wurden, blockieren die Epitop 3 zugehörige VHH L-8.

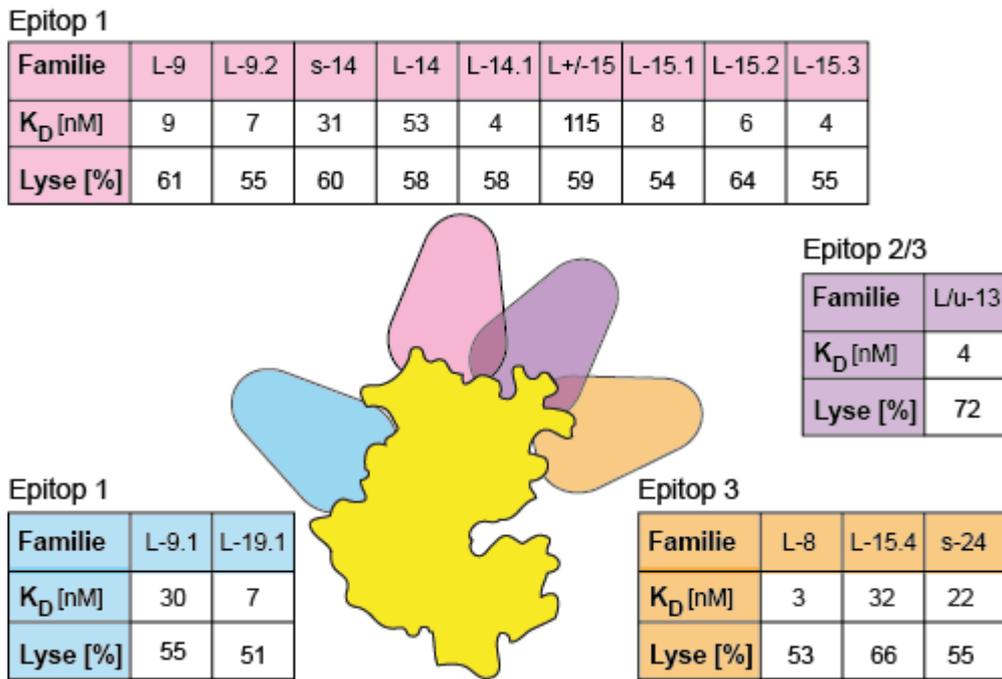


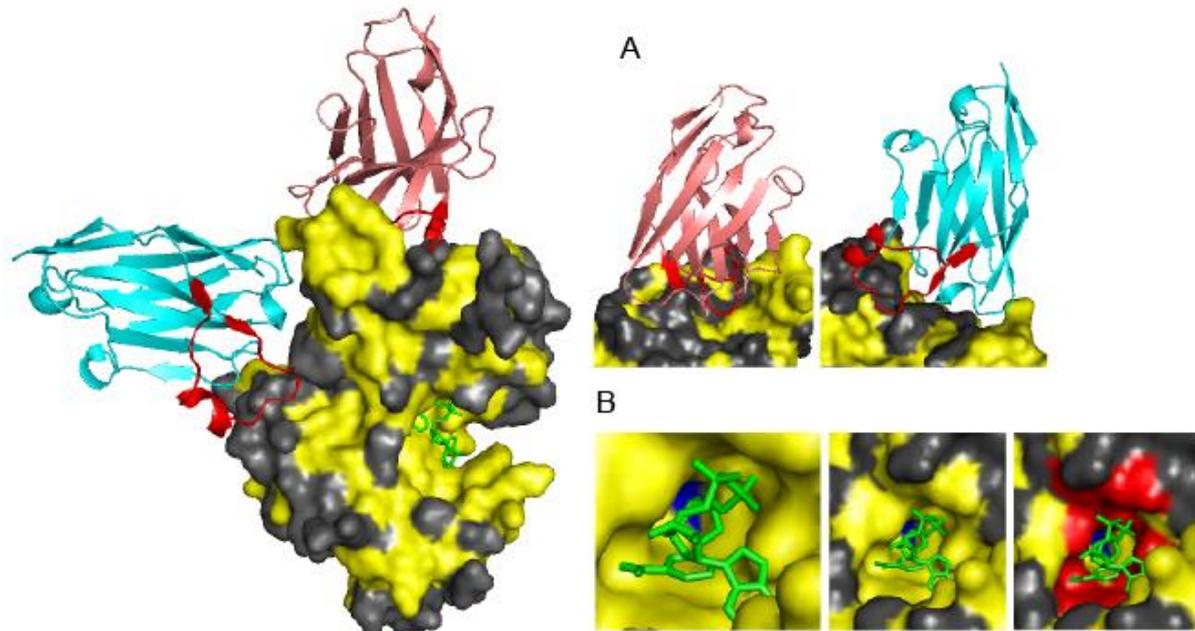
Abb. 5.4: Schematische Zuordnung der CD38-spezifischen VHHs zu ihren Epitopen. Den jeweiligen VHHs zugeordnet sind ihre K_D -Werte, die als Dissoziationskonstante die Affinität der VHHs zu ihrem Antigen ausdrücken. Als Verweis auf ihre zytotoxische Wirkung ist der prozentuale Anteil lysierter Zellen, den sie im CDC-Assay bei einstündiger Inkubation mit 1 μ l humanem Serum an YACHCD38-Zellen bewirkten, angegeben.

Das Epitop 1 erkennen VHH-Familien, deren CDR3 9 und 19 Aminosäuren beträgt, am Epitop 2 binden VHHs mit 9 bis 15 und am Epitop 3 mit 8 bis 24 Aminosäuren in der CDR3, sodass die Epitope durch ihre Struktur keine Spezifität für bestimmte CDR3-Dimensionen und durch diese bedingte Ausstülpungen erkennen lassen, wie sie als typisch für VHHs beschrieben werden.

Die Epitopzugehörigkeit der VHHs zeigt keinen Zusammenhang zum Grad der Affinität, die räumliche Entfernung der Epitope zur katalytischen Domäne korrespondiert jedoch mit dem Unvermögen der untersuchten 15 VHH-Familien zur Beeinflussung der enzymatischen Funktion von humanem CD38 in Bezug auf die NAD-Glykohydrolase-Aktivität.

CD38 ist ein Enzym, welches auch durch Lamas exprimiert wird und dessen enzymatisches Zentrum hochkonserviert ist. **Abb. 5.5** zeigt das humane CD38 mit grauer Markierung der Aminosäuren, die der Sequenz nach vom CD38 des Lamas abweichen. Beide bekannten Epitope liegen in solchen abweichenden Bereichen, sodass sie als fremd erkannt werden können (**Abb. 5.5A**). Deutlich zeigt sich hingegen die weitgehende Übereinstimmung bzw. hohe Konservierung des enzymatischen Zentrums, die eine Antigenerkennung in diesem Bereich erschwert. Die einzige abweichende Aminosäuresubstitution, in der Abbildung blau markiert, befindet sich sehr weit hinten im katalytischen Spalt, sodass durch ihre

Unzugänglichkeit keine Generierung von VHHs zu erwarten ist. Zur Verdeutlichung sind die als enzymatisch erkannten Aminosäuren rot dargestellt (**Abb. 5.5B**).



H	MANCEFSPVSGDKPCCRLSRRRAQLCLGVSILVLIIVVVLAVVV-----PRWRQQWSGPGTKRFPETVLARCVKYTE	72
L	-----LSRRAQICLCVFLCLLVGVIIAVVAGVRLWHQPLKHREWNGTGSTAHFQDIFLGRCYIYTQ	61
H	IH-PEMRHVDCQSVWDAFKGAFISKHPCNITEEDYQPLMKLGTQTVPCNKILLWSRIKDLAQFTQVQVQVDMFTLEDTL	149
L	LVQPEFRDRDCKKIEETFRNAFIFKDPCEVTEEDYHPLMELTSQTVPCKTQVFWSETKELAHQYTWVRQEMFTLENTL	139
H	LGYLADLTLWCGEFNTSKINYQSCPDWRKDCSNNPVSVFVKTVSRRFAEAACDVVHVMLNGSRSKIFDKNSTFFGSVEV	227
L	LGYVADGLTLWCGDSGSSEINYQSCPDWRKDCSNNPVSVFVKVLSKTFNAENACGMVQVVLNGSLSNVAFSKDSTFFGSVEV	217
H	HNLQPEKVQTLQAWVIHGGREDSRDLCQDPTIKELESIIKRNIIQFSCKNYRDPKFLQCVKNPEDSSCTSEI	300
L	HNLHPEKVHTLQAWVMHDIGKSPDLCSGSSIMDLKSIMSK-NIKFTCQDNY-PVKFLQCVKNPEDSSCSLRM	288

Abb. 5.5: Schematische Darstellung von humanem CD38 mit farblicher Kennzeichnung (grau) der beim Lama-CD38 abweichenden Aminosäuren. Das Substrat NAD im katalytischen Zentrum ist in Grün gezeigt. In Rosa dargestellt ist die VHH L-15.2, die das Epitop 2 besetzt, in Türkis dargestellt ist die VHH L-19.2, stellvertretend für das Epitop 1. Die CDR3-Region der VHHs ist jeweils in Rot gezeigt. **(A)** Die Epitope zeichnen sich durch vielfältige Aminosäuresubstitutionen gegenüber der Sequenz des Lama-CD38 aus. **(B)** Das katalytische Zentrum ist hochkonserviert, sodass sich in der näheren Umgebung keine Abweichungen zeigen. Sehr weit hinten und schwer zugänglich hinter dem Substrat befindet sich eine abweichende Aminosäure, die in Blau dargestellt ist. Die enzymatisch aktiven Aminosäuren sind rot gekennzeichnet. Zur Übersicht ist unten ein Sequenzalignment von humanem CD38 (H) und dem CD38 des Lamas (L) mit dem gleichen Farbcode dargestellt.

Um VHHs zu isolieren, die neue Epitope binden, können naive oder synthetische VHH-Bibliotheken unter Blockade der bereits bekannten Epitope einem Panning unterzogen werden. Für die fokussierte Suche nach VHHs, die einen im Voraus definierten Bereich ihres Antigens binden sollen, wurde bereits die Generierung einer VHH durch ein Screening mit einem synthetischen Peptid, welches mit der für die Bindung angestrebten Domäne des Zielsproteins korrespondiert, beschrieben (Tang et al., 2013). Auf diese Weise könnte nach

einer enzyminhibierenden VHH gesucht werden. Der Firma Unilever gelang die Isolation einer das SBE-A-Enzym der Kartoffel inhibierenden VHH aus einer großen, synthetischen VHH-Bibliothek (Jobling et al., 2003). Zur Vergrößerung des VHH-Repertoires von Bibliotheken bestehen Möglichkeiten wie error-prone PCR (Hawkins et al., 1992), chain shuffling (Marks et al., 1992) oder DNA shuffling (Cramer et al., 1996).

Eine Antagonisierung der ADPR-Zyklasefähigkeit von CD38 konnte in präklinischen Studien der monoklonale Antikörper SAR650984 zeigen (Martin et al., 2013, Martin et al., 2014, Sherbenou et al., 2014, Deckert et al., 2014). **Abb. 5.6A** zeigt das an CD38 gebundene Fab-Fragment des Antikörpers SAR650984. Die schwere Kette ist in dunklem Violett, die leichte Kette in hellerem Violett dargestellt. Die Inhibition der enzymatischen Funktion von CD38 basiert wahrscheinlich auf einem allosterischem Effekt. **5.6B** zeigt den räumlichen Zusammenhang des Epitops von SAR650984 in Violett und den enzymatisch wirksamen Aminosäuren des katalytischen Zentrums in Rot. Der Antikörper HB7 (**5.6C**), dessen Epitop sich mit dem Daratumumabs überlappt, weist hingegen keine Modifikation der enzymatischen Funktion von CD38 auf. **5.6D** zeigt, dass auch die Epitope 1 und 2 der hier besprochenen VHHs, die ebenfalls die enzymatische Funktion von CD38 nicht beeinflussen, räumlich distinkt von dem Epitop von SAR650984 sind. Das Epitop Daratumumabs, in Grün und Blau dargestellt, weist eine Überschneidung von einer Aminosäure, die zur Verdeutlichung in dunklem Grau gekennzeichnet wurde, auf (**5.6E**).

Die Produktion von SAR650984 als scFv könnte das Potenzial der Enzyminhibition mit den Vorteilen kleinerer Antikörperformate verbinden.

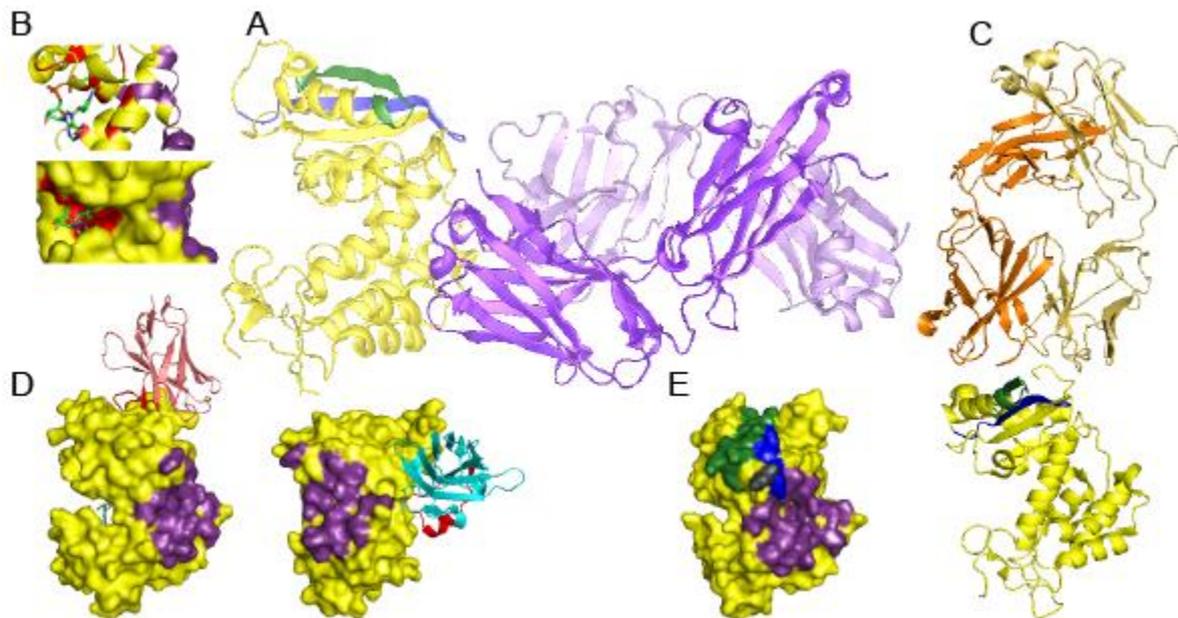


Abb. 5.6: Darstellung von CD38 mit gebundenen VHHs oder Antikörpern. (A) CD38 mit dem Antikörper SAR650984 (VH und CH1 in dunklem Violett, VL und CL in hellem Violett) und dem Epitop Daratumumabs (in Grün und Blau) als Cartoon. (B) Das katalytische Zentrum mit gebundenem NAD, den enzymatisch aktiven Aminosäuren in Rot und dem Epitop von SAR650984 in Violett. (C) CD38 mit dem Antikörper HB7 (VH und CH1 in dunklem Orange, VL und CL in hellem Orange). (D) Räumliche Beziehung des Epitops von SAR650984 (violett) zum Epitop von L-15.2 (rosa) und L-19.2 (türkis). (E) Die Epitope von Daratumumab und SAR650984.

5.5 CDC-Aktivität

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass alle 15 charakterisierten, an unterschiedlichen Epitopen bindenden VHH-Fcs der Lamas 10, 25, 538 und 539 in der Lage waren, in Verbindung mit 1 μ l humanem Serum eine zytotoxische Wirkung auf murine, stabil hCD38-transfizierte YAC-Zellen auszulösen, die durch die Mechanismen der CDC zu erklären ist. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass die Befähigung zur Induktion der CDC durch die Produktion des bereits publizierten, monoklonalen Antikörpers Daratumumab als scFv-Fc auf ein kleineres Antikörperformat übertragen werden konnte.

Dara-scFv-Fc zeigte sich in sämtlichen CDC-Assays als effektivster Initiator von CDC mit einer auf oben genannten Versuch bezogenen Lyserate von 82 %. Als potentestes VHH-Fc-Fusionsprotein zeigen sich VHH L/u-13 mit 72 %, VHH L-15.2 mit 64 %, VHH L-15.3 mit 65 % und VHH L-15.4 mit 66 %. Die übrigen VHH-Fc-Fusionsproteine liegen im Bereich zwischen 50 und 60 % (**Abb. 5.4**).

Die Ausprägung der CDC-Wirkung wird als Resultat des gebundenen Epitops diskutiert (De Weers et al., 2011; Tang et al., 2013; Pawluczkwycz et al., 2009). Experimentell erwies sich die Affinität von C1q, dem ersten Baustein der Komplementkaskade, zu den gebundenen Antikörpern als essenziell für das Ausmaß der Gesamtreaktion. Im Vergleich der CD20-

spezifischen Antikörper Ofatumumab und Rituximab konnte Rituximab durch geringere Affinität zu C1q auch in Gegenwart von komplementangereichertem Serum nur in geringem Grad CDC auslösen. Die größere CDC-Wirkung von Ofatumumab wird neben der höheren Affinität zu C1q auch der größeren Nähe des Epitops von Ofatumumab zur Zellmembran zugeschrieben, indem diese Lokalisierung die Agglomeration von aktiviertem Komplement fördert, vor löslichen inaktivierenden Wirkstoffen abschirmt und so die Generierung des membranangreifenden Komplexes fördert (Pawluczko et al., 2009). Von dieser These ausgehend wurde ein VHH-Fc-Fusionsprotein gegen Mesothelin generiert, das im Gegensatz zu den klinisch bereits erprobten Antikörpern ein Epitop nah an der Oberfläche bindet und erfolgreich CDC auslöst (Tang et al., 2013). Das CDC-Potenzial Daratumumabs wird seinem Epitop und der damit einhergehenden Positionierung des Fc-Fragments zugeschrieben, die eine größere Bindungskapazität und Aktivierung der Komplementproteine ermöglicht (De Weers et al., 2011). Da eine Intensivierung der CDC durch nichtkovalente Fc-Fc-Interaktionen der IgG-Antikörper mit Formierung zu Hexameren und einer C1q-Bindung mit hoher Avidität und effektiver Aktivierung der Komplementkaskade festgestellt wurde (Diebold et al., 2014), stellt sich das Epitop als Basis der IgG-Orientierung entscheidend für das CDC-Potenzial des bindenden Antikörpers dar.

Bezogen auf das humane CD38 scheint insbesondere das Epitop Daratumumabs, welches sich mit dem C-terminal gelegenen Epitop 2 der hier selektierten VHHs überlappt, einen großen Freiheitsgrad hinsichtlich der Hexamerisation zu gewähren.

5.6 Ausblick

In klinischen Studien zur Therapie von B-Zellerkrankungen wie dem MM und der CLL konnte der monoklonale Antikörper Daratumumab vor allem durch seine Potenz zur Auslösung von CDC überzeugen. VHHs haben gegenüber konventionellen Antikörpern vielfältige Vorteile und ihre Optimierung durch Beseitigung von CDC-inhibierenden Faktoren stellt eine mögliche Weiterentwicklung im Hinblick auf zukünftige diagnostische und therapeutische Nutzung dar.

Physiologische Inhibitoren der CDC sind mCRPs (membrane complement regulatory proteins), Membranproteine wie CD59, das die Anlagerung des membranangreifenden Komplexes einschränkt, oder CD55, das einen Bestandteil der Komplementkaskade inaktiviert. Diese Faktoren werden auch als ursächlich für entstehende Tumorresistenzen bezüglich der Rituximab-induzierten CDC-Wirkung genannt. Durch ihre Inhibition mittels scFvs konnte experimentell die CDC-Intensität von Rituximab gesteigert werden (Zhou et al., 2008, Ziller et al., 2005, Macor et al., 2007, Carter D., Lieber A., 2014).

Die molekulare Struktur von Fc-Fragmenten hat einen entscheidenden Einfluss auf den Grad der Hexamerisation von Fc-Anteilen und damit verbundenen Affinität von C1q (Diebolder et al., 2014). Durch die Möglichkeit zur unkomplizierten Fusion von VHHs und scFvs mit Fc-Anteilen, deren Fc-Fc-Kontaktformationen durch Punktmutagenese optimiert wurden, könnte das Potenzial zur Komplementaktivierung erweitert werden.

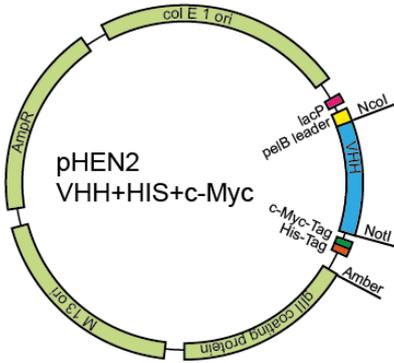
Die Lokalisation einiger Epitope kann außerdem zu sterischen Hindernissen bei der Hexamerisation von FC-Fragmenten führen. Diese Faktoren zeigen auf polyklonale Antikörper weniger Einfluss (Diebolder et al., 2014), sodass davon auszugehen ist, dass die Bindung von Antikörpern an unterschiedliche Epitope oder Antigene die Zusammenlagerung von Fc-Segmenten und effiziente Fc-Hexamerisation erleichtert. In Nachahmung polyklonaler Antikörper könnte die Überführung in bi- oder tetravalente und damit einhergehend multispezifische Formate die CDC-Potenz erheblich steigern. In Bezug auf diese Prämissen bieten Schwereketten-Antikörper ideale Voraussetzungen. Schon jetzt stehen hochaffine VHHs, die drei unterschiedliche Epitope von CD38 binden, zur Verfügung.

Insbesondere für das MM findet sich zurzeit eine Vielzahl potenzieller Antigene für die Antikörpertherapie in präklinischer oder klinischer Testung. Während CD38 unter diesen die größte klinische Relevanz hat, gibt es auch vielversprechende Ergebnisse für SLAMF7/CS1, CD74, CD40 und IGF-IR/CD221, ebenso wie für CD138 als Antigen der Toxin-konjugierten Antikörpertherapie (Sherbenou et al., 2014). Die Generierung bi- oder multispezifischer VHH-Fc-Formate, die eine Kombination dieser Antigene nutzen, und die Analyse ihrer CDC-Wirkung könnten von Relevanz für die Optimierung CD38-spezifischer Antikörperformate für die therapeutische Nutzung sein.

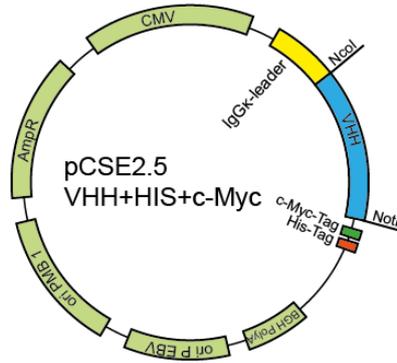
6 Anhang

6.1 Plasmidkarten

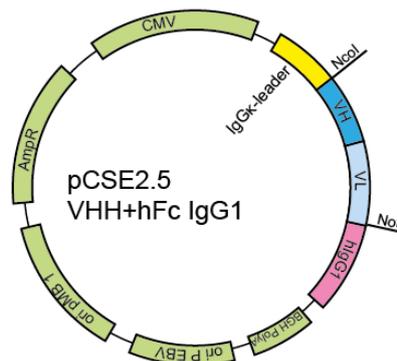
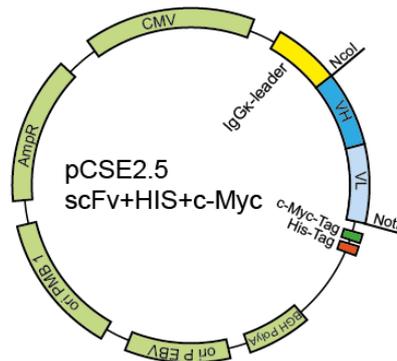
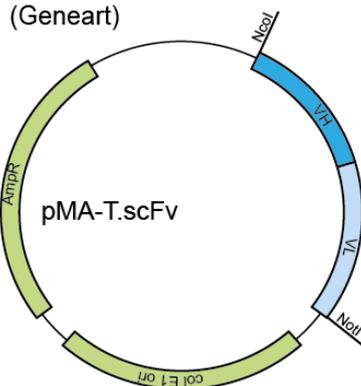
Phagen Display Vektor/
E. coli Expressionsvektor



HEK293-6E Expressionsvektor



Dara-ScFv Wirtsvektor
(Geneart)



6.3 Sequenzvergleich mit der Primärbibliothek

```

L-8a      LS CAASG IILRI YDMG--WYRQAPGKQRELVAATITSGGS---TN YAD SVKGR FT ISR DN AENTV SLQMN SLK PGDTAVYY CNADHTFAGVY-----WGQSTQVTVS
PB 3T30  LS CAASG IILRI YDMG--WYRQAPGKQRELVAATITSGGS---TN YAD SVKGR FT ISR DN AENTV SLQMN SLK PGDTAVYY CNADHTFAGVY-----WGQSTQVTVS
PB 3T40  LS CAASG IIVSS FAMB--WYRQAPGKQREFVARITSGGV---TT YAD SVKGR FT ISR DN AENTV SLQMN SLK PGDTAVYY CNADHTFAGVY-----WGQSTQVTVS
PB 3T42  LS CAASG IILRI YDMG--WYRQAPGKQRELVAEITSGGS---TN YAD SVKGR FT ISR DN AENTV SLQMN SLK PGDTAVYY CNADHTFAGVY-----WGQSTQVTVS
PB 3T60  LS CAASG IIVSS I NVMG--WYRQAPGKQRELVAEITSGGS---TN YAD SVKGR FT ISR DN AENTV SLQMN SLK PGDTAVYY CNADHTFAGVY-----WGQSTQVTVS
PB 3T71  LS CAASG IILRI YDMG--WYRQAPGKQRELVAATITSGGS---TN YAD SVKGR FT ISR DN AENTV SLQMN SLK PGDTAVYY CNADHTFAGVY-----WGQSTQVTVS

L-8c      LS CAASG IILRI YDMG--WYRQAPGKQRELVAATITSGGR---TN YAD SVKGR FT ISR DN AENTV SLQMN SLK PGDTAVYY CNADHTFAGVY-----WGQSTQVTVS
PB 3T30  LS CAASG IILRI YDMG--WYRQAPGKQRELVAATITSGGS---TN YAD SVKGR FT ISR DN AENTV SLQMN SLK PGDTAVYY CNADHTFAGVY-----WGQSTQVTVS
PB 3T40  LS CAASG IIVSS FAMB--WYRQAPGKQREFVARITSGGV---TT YAD SVKGR FT ISR DN AENTV SLQMN SLK PGDTAVYY CNADHTFAGVY-----WGQSTQVTVS
PB 3T42  LS CAASG IILRI YDMG--WYRQAPGKQRELVAEITSGGS---TN YAD SVKGR FT ISR DN AENTV SLQMN SLK PGDTAVYY CNADHTFAGVY-----WGQSTQVTVS
PB 3T60  LS CAASG IIVSS I NVMG--WYRQAPGKQRELVAEITSGGS---TN YAD SVKGR FT ISR DN AENTV SLQMN SLK PGDTAVYY CNADHTFAGVY-----WGQSTQVTVS
PB 3T71  LS CAASG IILRI YDMG--WYRQAPGKQRELVAATITSGGS---TN YAD SVKGR FT ISR DN AENTV SLQMN SLK PGDTAVYY CNADHTFAGVY-----WGQSTQVTVS

L-8e      LS CAASG IILRI YDMG--WYRQAPGKQRELVAEITSGGS---TN YAD SVKGR FT ISR DN AENTV SLQMN SLK PGDTAVYY CNADHTFAGVY-----WGQSTQVTVS
PB 3T30  LS CAASG IILRI YDMG--WYRQAPGKQRELVAEITSGGS---TN YAD SVKGR FT ISR DN AENTV SLQMN SLK PGDTAVYY CNADHTFAGVY-----WGQSTQVTVS
PB 3T40  LS CAASG IIVSS FAMB--WYRQAPGKQREFVARITSGGV---TT YAD SVKGR FT ISR DN AENTV SLQMN SLK PGDTAVYY CNADHTFAGVY-----WGQSTQVTVS
PB 3T42  LS CAASG IILRI YDMG--WYRQAPGKQRELVAEITSGGS---TN YAD SVKGR FT ISR DN AENTV SLQMN SLK PGDTAVYY CNADHTFAGVY-----WGQSTQVTVS
PB 3T60  LS CAASG IIVSS I NVMG--WYRQAPGKQRELVAEITSGGS---TN YAD SVKGR FT ISR DN AENTV SLQMN SLK PGDTAVYY CNADHTFAGVY-----WGQSTQVTVS
PB 3T71  LS CAASG IILRI YDMG--WYRQAPGKQRELVAEITSGGS---TN YAD SVKGR FT ISR DN AENTV SLQMN SLK PGDTAVYY CNADHTFAGVY-----WGQSTQVTVS

L-8d      LS CAASG IILRI YDMG--WYRQADGKQRELVAEITSGGS---TN YAD SVKGR FT ISR DN AENTV SLQMN SLK PGDTAVYY CNADHTFAGVY-----WGQSTQVTVS
PB 3T31  LS CAASG IILRI YDMG--WYRQAPGKQRELVAEITSGGS---TN YAD SVKGR FT ISR DN AENTV SLQMN SLK PGDTAVYY CNADHTFAGVY-----WGQSTQVTVS

L-8f      LS CAASGRTFNINAMG--WYRQAPGKQRELVAEATITSGGS---TN YAD SVKGR FT ISR DN AENTV SLQMN SLK PGDTAVYY CNADHTFAGVY-----WGQSTQVTVS
PB 3T31  LS CAASG IILRI YDMG--WYRQAPGKQRELVAEITSGGS---TN YAD SVKGR FT ISR DN AENTV SLQMN SLK PGDTAVYY CNADHTFAGVY-----WGQSTQVTVS

L-9.1a    LS CVGSE RIFSRNTMG--WYRQAPGKQRELVAEITSGSI---TN YAD SVKGR FT ISS DN AENTV YLQMN NLK PGDTAVYY CNYNHYAAGR DY-----WGQSTQVTVS
PB 3T48  LS CAASE RIFSRNTMG--WYRQAPGKQRELVAEITSLGI---TD YAD SVKGR FT ISS DN AENTV YLQMN NLK PGDTAVYY CNYNHYAAGR DY-----WGQSTQVTVS
PB 3T53  LS CVASE RIFSRNTMG--WYRQAPGKQRELVAEITSLGI---TN YAD SVKGR FT ISS DN AENTV YLQMN NLK PGDTAVYY CNYNHYAAGR DY-----WGQSTQVTVS
PB 3T293  LS CVASE RIFSRNTMG--WYRQAPGKQRELVAEITSGSI---TN YAD SVKGR FT ISS DN AENTV YLQMN NLK PGDTAVYY CNYNHYAAGR DY-----WGQSTQVTVS
PB 3T298  LS CVGSE RIFSRNTMG--WYRQAPGKQRELVAEITSLGI---TN YAD SVKGR FT ISS DN AENTV YLQMN NLK PGDTAVYY CNYNHYAAGR DY-----WGQSTQVTVS

L-9.1b    LS CVASE RIFSRNTMG--WYRQAPGKQRELVAEITSLGI---AN YAD SVKGR FT ISS DN AENTV YLQMN NLK PGDTAVYY CNYNHYAAGR DY-----WGQSTQVTVS
PB 3T48  LS CAASE RIFSRNTMG--WYRQAPGKQRELVAEITSLGI---TD YAD SVKGR FT ISS DN AENTV YLQMN NLK PGDTAVYY CNYNHYAAGR DY-----WGQSTQVTVS
PB 3T53  LS CVASE RIFSRNTMG--WYRQAPGKQRELVAEITSLGI---TN YAD SVKGR FT ISS DN AENTV YLQMN NLK PGDTAVYY CNYNHYAAGR DY-----WGQSTQVTVS
PB 3T293  LS CVASE RIFSRNTMG--WYRQAPGKQRELVAEITSGSI---TN YAD SVKGR FT ISS DN AENTV YLQMN NLK PGDTAVYY CNYNHYAAGR DY-----WGQSTQVTVS
PB 3T298  LS CVGSE RIFSRNTMG--WYRQAPGKQRELVAEITSLGI---TN YAD SVKGR FT ISS DN AENTV YLQMN NLK PGDTAVYY CNYNHYAAGR DY-----WGQSTQVTVS

L-9.1c    LS CVASE RIFSRNTMG--WYRQAPGKQRELVAEITSLGI---TN YAD SVKGR FT ISS DN AENTV YLQMN NLK PGDTAVYY CNYNHYAAGR DY-----WGQSTQVTVS
PB 3T48  LS CAASE RIFSRNTMG--WYRQAPGKQRELVAEITSLGI---TD YAD SVKGR FT ISS DN AENTV YLQMN NLK PGDTAVYY CNYNHYAAGR DY-----WGQSTQVTVS
PB 3T53  LS CVASE RIFSRNTMG--WYRQAPGKQRELVAEITSLGI---TN YAD SVKGR FT ISS DN AENTV YLQMN NLK PGDTAVYY CNYNHYAAGR DY-----WGQSTQVTVS
PB 3T293  LS CVASE RIFSRNTMG--WYRQAPGKQRELVAEITSGSI---TN YAD SVKGR FT ISS DN AENTV YLQMN NLK PGDTAVYY CNYNHYAAGR DY-----WGQSTQVTVS
PB 3T298  LS CVGSE RIFSRNTMG--WYRQAPGKQRELVAEITSLGI---TN YAD SVKGR FT ISS DN AENTV YLQMN NLK PGDTAVYY CNYNHYAAGR DY-----WGQSTQVTVS

L-12.1    LS CAASGRTFSSVAMG--WYRQAPGKQREFVATINWSSGR---TT YAD SVKGR FT ISRD S AENTV YLQMN SLK PGDTAVYY CAADRFSWAVEYDY-----WGQSTQVTVS
PB 3T47  LS CAASGRTFSSVAMG--WYRQAPGKQREFVATINWSSGR---TT YAD SVKGR FT ISRD S AENTV YLQMN SLK PGDTAVYY CAADRFSWAVEYDY-----WGQSTQVTVS

```

Abb. 6.1: Vergleich der Aminosäuresequenzen von VHH-Familien aus der Primärbibliothek und nach dem Antigen-spezifischen Panning. Die drei CDR-Regionen (CDR1: rot, CDR2: grün und CDR3: blau) sind farbig hervorgehoben. Gelb hinterlegt sind die kanonischen Cysteinepaare in FR1 und FR3. Jeweils oben ist eine VHH aus dem Antigen-spezifischen Panning abgebildet, darunter die ähnlichen oder identischen Vertreter aus der Primärbibliothek (PB) unter Angabe der Nummer des Klon. Differenzen sind grau, identische Isolate der Primärbibliothek sind türkis markiert.

Literaturverzeichnis

- An Z. (2010) Monoclonal antibodies – a proven and rapidly expanding therapeutic modality for human diseases. *Protein Cell* 1 (4): 319-330
- Bannas P, Well L, Lenz A, Rissiek B, Haag F, Schmid J, Hochgräfe K, Trepel M, Adam G, Ittrich H & Koch-Nolte F (2014) In vivo near-infrared fluorescence targeting of T cells: comparison of nanobodies and conventional monoclonal antibodies. *Contrast Media Mol Imaging* 9: 135–142
- Bell A., Wang Z. J., Arbabi-Ghahroudi M., Chang T. A., Durocher Y., Trojahn U., Baardsnes J., Jaramillo M. L., Li S., Baral T. N., O'Connor-McCourt M., MacKenzie R., Zhang J. (2010) Differential tumor-targeting abilities of three single-domain antibody formats. *Cancer Lett.* 289: 81–90
- Berthelie, V., Tixier, J. M., Muller-Steffner, H. Schuber, F., Deterre, P (1998) Human CD38 is an authentic NAD(P)+ glycohydrolase. *Biochem J* 330: 1383 - 1390
- Bofill, M., Borthwick, N. J. (2000) CD38 in health and disease. In: Mehta, K., Malavasi, F. (Eds.). *Human CD38 and related molecules. Chemical Immunology* 75: 218 - 234.
- Bolognesi A., Polito L., Farini V., Bortolotti M., Tazzari P. L., Ratta M., Ravaioli A., Horenstein A. L., Stirpe F., Battelli M. G., Malavasi F. (2005) CD38 as a target of IB4 mAb carrying saporin-S6: design of an immunotoxin for ex vivo depletion of hematological CD38+ neoplasia. *J Biol Regul Homeost Agents* 19 (3-4): 145-152
- Burger J. A. (2011) Nurture versus nature: the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011: 96-103
- Calissano C., Damle R. N., Hayes G., Murphy E. J., Hellerstein M. K., Moreno C., Sison C., Kaufman M. S., Kolitz J. E., Allen S. L., Rai K. R., Chiorazzi N. (2009) In vivo intracloonal kinetic heterogeneity in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 114 (23): 4832-4842
- Carter D., Lieber A. (2014) Protein engineering to target complement evasion in cancer. *FEBS Letters* 588 (2): 334-340
- Chakravarty R., Goel S., Cai W. (2014) Nanobody: The 'Magic Bullet' for molecular imaging? *Theranostics* 4: 386–398
- Chen, J., Chen, Y.-G., Reifsnnyder, P. C., Schott, W. H., Lee, C.-H. Osborne, M., Scheuplein, F., Haag, F., Koch-Nolte, F., Serreze, D. V., Leiter, E. H. (2006) Targeted disruption of CD38 accelerates autoimmune diabetes in NOD/Lt mice by enhancing autoimmunity in an ADP-Ribosyltransferase 2-dependent fashion. *J Immunol* 176: 4590 - 4599

- Chen-Kiang S. (2005) Biology of plasma cells. *Best Pract Res Clin Haematol* 18: 493-507
- Chillemi A., Zaccarello G., Quarona V., Ferracin M., Ghimenti C., Massaia M., Horenstein A. L., Malavasi F. (2013) Anti-CD38 antibody therapy: windows of opportunity yielded by the target molecule. *Mol Med* 19: 99-108.
- Chillemi A., Zaccarello G., Quarona V., Lazaretti M., Martella E., Giuliani N., Ferracini R., Pistoia V., Horenstein A. L., Malavasi F. (2014) CD38 and bone marrow microenvironment. *FBS* 19: 152-162
- Clynes R. A., Towers T. L., Presta L. G., Ravetch J. V. (2000) Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med* 6 (4): 443-446
- Cockayne D.A., Muchamuel T., Grimaldi J. C., Muller-Steffner H., Randall T. D., Lund F. E., Murray R., Schuber F., Howard M. C. (1998) Mice deficient for the ecto-nicotinamide adenine dinucleotide glycohydrolase CD38 exhibit altered humoral immune responses. *Blood* 92: 1324–1333
- Conrath K. E., Lauwereys M., Galleni M., Matagne A., Frère J. M., Kinne J., Wyns L., Muyldermans S. (2001) Beta-lactamase inhibitors derived from single-domain antibody fragments elicited in the camelidae. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 2807–2812
- Cortez-Retamozo V., Backmann N., Senter P. D., Wernery U., De Baetselier P., Muyldermans S., Revets H. (2004) Efficient cancer therapy with a nanobody-based conjugate. *Cancer Res.* 64: 2853–2857
- Cramer A., Cwirla S., Stemmer W. P. (1996) Construction and evolution of antibody-phage libraries by DNA shuffling. *Nat Med* 2 (1): 100-102
- Danquah W. (2012) Selection and characterization of llama-derived anti-P2X7 single domain antibodies. Dissertation, Universität Hamburg, MIN-Fakultät
- Deaglio S., Mallone R., Baj G., Arnulfo A., Surico N., Dianzani U., Mehta K., Malavasi F. (2000) CD38/CD31, a receptor/ligand system ruling adhesion and signaling in human leukocytes. *Chem Immunol* 75: 99-120
- Deaglio S., Mehta K., Malavasi F. (2001) Human CD38: a (r)evolutionary story of enzymes and receptors. *Millenium review. Leuk Res* 25 (2001): 1-12
- Deaglio S., Capobianco A., Bergui L., Dürig J., Morabito F., Dührsen U., Malavasi F. (2003) CD38 is a signaling molecule in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 102 (6): 2146-2155
- Deaglio S., Vaisitti T., Bergui L., Bonello L., Horenstein A. L., Tamagnone L., Bousmell L., Malavasi F. (2005) CD38 and CD100 lead a network of surface receptors relaying positive signals for B-CLL growth and survival. *Blood* 105 (8): 3042-3050

- Deaglio S., Vaisitti T., Billington R., Bergui L., Omede P., Genazzani A. A., Malavasi F. (2007) CD38/CD19: a lipid raft-dependent signaling complex in human B cells. *Blood* 109 (12): 5390-5398
- Deaglio S., Vaisitti T., Aydin S., Bergui L., D'Arena G., Bonello L., Omede P., Scatolini M., Jakssic O., Chiorini G., Efremov D., Malavasi F. (2007a) CD38 und ZAP-70 are functionally linked and mark CLL cells with high migratory potential. *Blood* 110 (12): 4012-4021
- Deaglio S., Aydin S., Vaisitti T., Bergui L., Malavasi F. (2008) CD38 at the junction between prognostic marker and therapeutic target. *Trends Mol Med.* 14 (5): 210-218
- Deaglio, S., Robson, S. C. (2011) Ectonucleotidases as regulators of purinergic signaling in thrombosis, inflammation, and immunity. *Advances in Pharmacology* 61: 301 – 332
- Deckert J., Wetzel M.-C., Bartle L. M., Skaletskaya A., Goldmacher V. S., Vallée F., Zhou-Liu Q., Ferrari P., Pouzieux S., Lahoute C., Dumontet C., Plesa A., Chiron M., Lejeune P., Chittenden T., Park P. U., Blanc V. (2014) SAR650984, A novel humanized CD38-targeting antibody, demonstrates potent antitumor activity in models of multiple myeloma and other CD38+ hematologic malignancies. *Clin Cancer Res* 20 (17): 4574-4584
- De Genst E., Silence K., Decanniere K., Conrath K., Loris R., Kinne J., Muyldermans S., Wyns L. (2006) Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy-chain antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(12):4586-91
- De Genst E., Saerens D., Muyldermans S., Conrath K. (2006a) Antibody repertoire development in camelids. *DCI* 30: 187–198
- Desmyter A., Decanniere K., Muyldermans S., Wyns L. (2001) Antigen specificity and high affinity binding provided by one single loop of a camel single-domain antibody. *J. Biol. Chem.* 276: 26285–26290
- Desmyter A., Transue T. R., Ghahroudi M. A., Thi M. H., Poortmans F., Hamers R., Muyldermans S., Wyns L. (1996) Crystal structure of a camel single-domain VH antibody fragment in complex with lysozyme. *Nat Struct Biol* 3: 803–811
- De Weers M., Tai Y.-T., Van der Veer M. S., Bakker J. M., Vink T., Jacobs D. C. H., Oomen L. A., Peipp M., Valerius T., Slootstra J. W., Mutis T., Bleeker W. K., Anderson K. C., Lokhorst H. M., Van de Winkel J. G. J., Parren P. W. H. I. (2011) Daratumumab, a novel therapeutic human CD38 monoclonal antibody, induces killing of multiple myeloma and other hematological tumors. *J Immunol* 186: 1840-1848
- Diebold C. A., Beurskens F. J., De Jong R. N., Koning R. I., Strumane K., Lindorfer M. A., Voorhorst M., Ugurlar D., Rosati S., Heck A. J., Van de Winkel J. G., Wilson I. A.,

- Koster A. J., Taylor R. P., Saphire E. O., Burton D. R., Schuurman J., Gros P., Parren P. W. (2014) Complement is activated by IgG hexamers assembled at the cell surface. *Science* 343 (6176): 1260-1263
- Dumoulin M., Conrath K., Van Meirhaeghe A., Meersman F., Heremans K., Frenken L. G. J., Muyldermans S., Wyns L., Matagne A. (2002) Single-domain antibody fragments with high conformational stability. *Protein Sci.* 11: 500–515
- Emmerson C. D., Van der Vlist E. J., Braam M. R., Vanlandschoot P., Merchiers P., De Haard H. J. W., Verrips C. T., Van Bergen en Henegouwen P. M. P., Dolk E. (2011) Enhancement of polymeric immunoglobulin receptor transcytosis by biparatopic VHH. *PLoS ONE* 6: e26299
- Frangioni J. V. (2008) New Technologies for human Cancer Imaging. *J Clin Oncol* 26 (24):4012-4021
- Gaikam L. O., Huang L., Caveliers V., Keyaerts M., Hernot S., Vaneycken I., Vanhove C., Revets H., De Baetselier P., Lahoutte T. (2008) Comparison of the biodistribution and tumor targeting of two ^{99m}Tc-labeled anti-EGFR nanobodies in mice, using pinhole SPECT/micro-CT. *J Nucl Med* 49 (5): 788-795
- Gauberti M., Montagne A., Quenault A., Vivien D. (2014) Molecular magnetic resonance imaging of brain-immune interactions. *Front Cell Neurosci* 8: 389
- Guse, A. H. (1999) Cyclic ADP-Ribose: A novel Ca²⁺-mobilising second messenger. *Cell Signal* 11: 309 - 316
- Hamers-Casterman C., Atarhouch T., Muyldermans S., Robinson G., Hamers C., Songa E. B., Bendahman N., Hamers R. (1993) Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* 363: 446–448
- Hara-Yokoyama M., Kukimoto-Niino M., Terasawa K., Harumiya S., podyma-Inoue K. A., Hino N., Sakamoto K., Itoh S., Hashii N., Hiruta Y., Kawasaki N., Mishima-Tsumagari C., Kaitsu Y., Matsumoto T., Wakiyama M., Shirouzu M., Kasama T., Takayanagi H., Utsunomiya-Tate N., Takatsu K., Katada T., Hirabayashi Y., Yokohama S., Yanagishita M. (2012) Tetrameric interaction of the ectoenzyme CD38 on the cell surface enables its catalytic and raft-association activities. *Structure* 20 (9): 1585-1595
- Harjunpää A., Junnikala S., Meri S. (2000) Rituximab (anti-CD20) therapy of B-cell lymphomas: Direct complement killing is superior to cellular effector mechanisms. *Scand J Immunol* 51: 634-641
- Harmsen M. M., De Hard H. J. (2007) Properties, production, and applications of Camelid single-domain antibody fragments. Mini-Review. *Appl Microbiol Biotechnol* 77 : 13-22

- Harries M., Smith I. (2002) The development and clinical use of trastuzumab (Herceptin). *Endocr-Relat Cancer* 9: 75-85
- Hawkins R. E., Russell S. J., Winter G. (1992) Selection of phage antibodies by binding affinity. Mimicking affinity maturation. *J Mol Biol* 226 (3): 889-896
- Higashida H., Yokoyama S., Huang J. J., Liu L., Ma W. J., Akther S., Higashida C., Kikuchi M., Minabe Y., Munesue T. (2012) Social memory, amnesia and autism: brain oxytocin secretion is regulated by NAD⁺ metabolites and single nucleotide polymorphisms of CD38. *Neurochem Int* 61 (6): 828-838
- Höpken, U. E., Lipp, M. (2004) All roads lead to Rome: Triggering dendritic cell migration. *Immunity* 20: 244 - 246
- Holliger P., Hudson P. J. (2005) Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol* 23: 1126–1136
- Holz J.-B. (2012) The TITAN trial--assessing the efficacy and safety of an anti-von Willebrand factor Nanobody in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Transfus. Apher. Sci.* 46: 343–346
- Hussack G., Hirama T., Ding W., Mackenzie R., Tanha J. (2011) 2 Engineered single-domain antibodies with high protease resistance and thermal stability. *PLoS One.* 6(11):e28218
- Huston J. S., Mudgett-Hunter M., Tai M. S., McCartney J., Warren F., Haber E., Oppermann H. (1991) Protein engineering of single-chain Fv analogs and fusion proteins. *Methods Enzymol* 203: 46–88
- Inoue H., Suganami A., Ishida I., Tamura Y., Maeda Y. (2013). Affinity maturation of a CDR3-grafted VHH using in silico analysis and surface plasmon resonance. *J Biochem.* 2013 Aug 26. [Epub ahead of print]
- Jäger V., Büssow K., Wagner A., Weber S., Hust M., Frenzel A., Schirrmann T. (2013) High level transient production of recombinant antibodies and antibody fusion proteins in HEK293 cells. *BMC Biotechnol* 13(1):52
- Jansen M. J., Boross P., Overdijk M., Van Bueren J., Parren P., Leusen J. (2012) Daratumumab, a human CD38 antibody induces apoptosis of myeloma tumor cells via fc receptor-mediated crosslinking. *ASH Annual Meeting.* 9 December, Atlanta, GA
- Jin, D., Liu, H. X., Hirai, H., Torashima, T., Nagai, T., Lopatina, O., Shnayder, N. A., Yamada, K., Noda, M., Seike, T., Fujita, K., Takasawa, S., Yokoyama, S., Koizumi, K., Shiraishi, Y., Tanaka, S., Hashii, M., Yoshihara, T., Higashida, K., Islam, M. S., Yamada, N., Hayashi, K., Noguchi, N., Kato, I., Okamoto, H., Matsushima, A., Salmina, A., Munesue, T., Shimizu, N., Mochida, S., Asano, M., Higashida, H. (2007) CD38 is critical for social behaviour by regulating oxytocin secretion. *Nature* 446: 41 - 45

- Jobling S. A., Jarman C., Teh M. M., Holmberg N., Blake C., Verhoeven M. E. (2003) Immunomodulation of enzyme function in plants by single-domain antibody fragments. *Nat Biotechnol* 21 (1): 77-80
- Karyampudi L., Knutson K. L. (2010) Antibodies in cancer immunotherapy. *Cancer Biomark* 6 (5-6): 291-305
- Kazemi T., Younesi V., Jadidi-Niaragh F., Yousefi M. (2015) Immunotherapeutic approaches for cancer therapy: An updated review. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*: 1-11. [Epub ahead of print]
- Kirchhofer A., Helma J., Schmidthals K., Frauer C., Cui S., Karcher A., Pellis M., Muyldermans S., Casas-Delucchi C. S., Cardoso M. C., Leonhardt H., Hopfner K. P., Rothbauer U. (2010) Modulation of protein properties in living cells using nanobodies. *Nat Struct Mol Biol.* 17(1):133-8
- Koch-Nolte F., Duffy T., Nissen M., Kahl S., Killeen N., Ablamunits V., Haag F., Leiter E. H. (1999) A new monoclonal antibody detects a developmentally regulated mouse ecto-ADP-ribosyltransferase on T cells: subset distribution, inbred strain variation, and modulation upon T cell activation. *J Immunol* 163: 6014–6022
- Koch-Nolte, F., Adriouch, S., Bannas, P., Krebs, C., Scheuplein, F., Seman, M., Haag, F. (2006) ADP-Ribosylation of membrane proteins: Unveiling the secrets of a crucial regulatory mechanism in mammalian cells. *Ann Med* 38: 188 - 199
- Koch-Nolte F., Reyelt J., Schössow B., Schwarz N., Scheuplein F., Rothenburg S., Haag F., Alzogaray V., Cauerhff A., Goldbaum F. A. (2007). Single domain antibodies from llama effectively and specifically block T cell ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.2 in vivo. *FASEB J.* 21(13):3490-8
- Koh W. W. L., Steffensen S., Gonzalez-Pajuelo M., Hoorelbeke B., Gorlani A., Szynol A., Forsman A., Aasa-Chapman M. M. I., De Haard H., Verrips T., Weiss R. A. (2010) Generation of a family-specific phage library of llama single chain antibody fragments that neutralize HIV-1. *JBC* 285: 19116–19124
- Kratz F., Elsadek B. (2012) Clinical impact of serum proteins on drug delivery. *J Control Release* 161: 429–445
- Lande R., Urbani F., Di Carlo B., Sconocchia G., Deaglio S., Funaro A., Malavasi F., Ausiello C. M. (2002) CD38 ligation plays a direct role in the induction of IL-1 β , IL-6, and IL-10 secretion in resting human monocytes. *Cellular Immunology* 220 (1): 30-38
- Lee H. C. (2006) Structure and Enzymatic Functions of Human CD38. *Mol Med* 12 (11-12): 317-323

- Lee, H. C. (2001) Physiological functions of cyclic ADP-Ribose and NAADP as **calcium** messengers. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41: 317 - 345
- Lee, H. C., Munshi, C., Graeff, R. (1999) Structures and activities of cyclic ADPRibose, NAADP and their metabolic enzymes. *Mol Cell Biochem* 193, 89 - 98
- Li T., Bourgeois J.-P., Celli S., Glacial F., Le Sourd A.-M., Mecheri S., Weksler B., Romero I., Couraud P.-O., Rougeon F., Lafaye P. (2012) Cell-penetrating anti-GFAP VHH and corresponding fluorescent fusion protein VHH-GFP spontaneously cross the bloodbrain barrier and specifically recognize astrocytes: application to brain imaging. *FASEB J* 26: 3969–3979
- Liu Q., Graeff R., Kriksunov I. A., Lam C. M. C., Lee H. C., Hao Q. (2008) Conformational Closure of the Catalytic Site of Human CD38 Induced by Calcium. *Biochemistry* 2008, 47: 13966-13973
- Liu Q., Kriksunov I. A., Graeff R., Munshi C., Lee H. C., Hao Q. (2005) Crystal structure of human CD38 extracellular domain. *Structure* 13 (9): 1331-1339
- Liu Q., Kriksunov I. A., Graeff R., Munshi C., Lee H. C., Hao Q. (2006) Structural basis for the mechanistic understanding of human CD38-controlled multiple catalysis. *J Biol Chem* 281 (43): 32861-32869
- Lokhorst H. M., Laubach J. P., Nahi H., Plesner T., Gimsing P., Hansson M., Minnama M., Lassen U. N., Krejcik J., Ahmadi T., Lisby S., Basse L., Brun N. C., Richardson P. G. (2014) Dose-dependent efficacy of Daratumumab (DARA) as monotherapy in patients with relapsed or refractory multiple myeloma. *J Clin Oncol* 32 (Abstract 8513)
- Lonial S., Weiss B. M., Usmani S. Z., Singhal S., Chari A., Bahlis N. J., Belch A., Krishnan A. Y., Vescio R. A., Mateos M. V., Mazunder A., Orłowski R. Z., Sutherland H. J., Blade J., Scott E. C., Feng H., Khan I., Uhlir C. M., Ahmadi T., Voorhees P. M. (2015) Phase II study of daratumumab (DARA) monotherapy in patients with ≥ 3 lines of prior therapy or double refractory multiple myeloma (MM): 54767414MMY2002 (Sirius). *J Clin Oncol* 33 (Abstract 8512)
- Lund, F. E., Solvason, N., Grimaldi, J. C., Michael E., Parkhouse, R., Howard, M. C. (1995) Murine CD38: An immunoregulatory ectoenzyme. *Immunology Today* 16: 469 - 473
- Lund, F. E., Naixuan, Y., Kwang-Myong, K., Reth, M., Howard, M. C. (1996) Signaling through CD38 augments B cell antigen receptor (BCR) responses and is dependent on BCR expression. *J Immunol* 157: 1455 - 1567
- Maass D.R., Sepulveda J., Pernthaner A., Shoemaker C. B. (2007) Alpaca (*Lama pacos*) as a convenient source of recombinant camelid heavy chain antibodies (VHHs). *J Immunol Methods*. 324(1-2):13-25

- Maass N., Schütz F., Fascing P. A., Fehm T., Janni W., Kümmel S., Kolberg H. C., Lüftner D., Wallwiener M., Lux M. P. (2015) Breast cancer update 2014 – Focus on the patient and the tumor. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 75 (2): 170-182
- Macor P., Tripodo C., Zorzet S., Piovan E., Bossi F., Marzari R., Amadori A., Tedesco F. (2007) In vivo targeting of human neutralizing antibodies against CD55 and CD59 to lymphoma cells increases the anti-tumor activity of rituximab. *Cancer Res* 67: 10556-10563
- Malavasi F., Deaglio S., Funaro A., Ferrero E., Horenstein A. L., Ortolan E., Vaisitti T., Aydin S. (2008) Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology. *Physiol Rev.* 88 (3): 841-886
- Malavasi F., Deaglio S., Damle R., Cutrona G., Ferrarini M., Chiorazzi N. (2011) CD38 and chronic lymphocytic leukemia: a decade later. *Blood* 118 (13): 3470-3478
- Mallone R., Ortolan E., Baj G., Funaro A., Giunti S., Lillaz E., Saccucci F., Cassader M., Cavallo-Perin P., Malavasi F. (2001) Autoantibody response to CD38 in Caucasian patients with type 1 and type 2 diabetes: immunological and genetic characterization. *Diabetes* 50 (4): 752-762
- Mallone R., Ortolan E., Pinach S., Volante M., Zanone M. M., Bruno G., Baj G., Lohmann T., Cavallo-Perin P., Malavasi F. (2002) Anti-CD38 autoantibodies: characterisation in new-onset type I diabetes and latent autoimmune diabetes of the adult (LADA) and comparison with other islet autoantibodies. *Diabetologica* 45 (12): 1667-1677
- Marks J. D., Griffiths A. D., Malmqvist M., Clackson T. P., Bye J. M., Winter G. (1992) Bypassing immunization: building high affinity human antibodies by chain shuffling. *Biotechnology (N Y)* 10 (7): 779-783
- Martin T. G., Strickland S. A., Glenn M., Zheng W., Daskalakis N., Mikhael J. R. (2012) SAR650984 a CD38 monoclonal antibody in patients with selected CD38+ hematological malignancies – data from a dose-escalation phase I study. *Blood* 122 (21) (Abstract 284)
- Martin T. G., Hsu K., Charpentier E., Vij R., Baz R. C., Benson D. M. (2013) A phase Ib dose escalation trial of SAR650984 (anti CD-38 mAb) in combination with lenadomide and dexamethasone in relapsed/refractory multiple myeloma. *ASCO Meet Abstr* 32 (Suppl. 8) (Abstract 8512)
- McCafferty J., Griffiths A. D., Winter G., Chiswell D. J. (1990) Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 348: 552–554

- Mehta K., Ocanas L., Malavasi F., Marks J. W., Rosenblum M. G. (2004) Retinoic acid-induced CD38 antigen as a target for immunotoxin-mediated killing of leukemia cells. *Mol Cancer Ther* 3 (3): 345-352
- Meng R., Smallshaw J. E., Pop L. M., Yen M., Liu X., Le L., Ghetie M.-A., Vitetta E. S., Ghetie V. (2004) The evaluation of recombinant, chimeric, tetravalent antihuman CD22 antibodies. *Clin Cancer Res* 10: 1274-1281
- Menzel S., Rissiek B., Haag F., Goldbaum F. A., Koch-Nolte F. (2013) The art of blocking ADP-ribosyltransferases (ARTs): nanobodies as experimental and therapeutic tools to block mammalian and toxin ARTs. *FEBS J.* 280: 3543–3550
- Menzel S. (2014) Regulation der ADP-Ribosyltransferase ARTC2.2 durch Nukleotid-induzierte Proteolyse. Dissertation, Universität Hamburg, MIN-Fakultät
- Munshi C., Aarhus R., Graeff R., Walseth T. F., Levitt D., Lee H. C. (2000) Identification of the enzymatic active site of CD38 by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 275: 21566-21571
- Murphy, K., Travers, P., Walport, M. (2008) *Janeway's Immunobiology*. 7. Ed. Garland Science, New York, London.
- Muyldermans S. (2013) Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annu. Rev. Biochem.* 82: 775–797
- Muyldermans S., Atarhouch T., Saldanha J., Barbosa J. A., Hamers R. (1994) Sequence and structure of VH domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains. *Protein Eng.* 7: 1129–1135
- Nguyen V. K., Su C., Muyldermans S., Van der Loo W. (2002) Heavy-chain antibodies in Camelidae; a case of evolutionary innovation. *Immunogenetics* 54: 39–47
- Nijhof I. S., Lammerts van Beuren J. J., Van Kessel B., Andre P., Morel Y., Lokhorst H. M., Van de Donk N. W. C. J., Parren P. W. H. I., Mutis T. (2015) Daratumumab-mediated lysis of primary multiple myeloma cells is enhanced in combination with the human anti-KIR antibody IPH2102 and lenadomide. *Haematologica* 100 (2): 263-268
- Olafsen T., Wu A. M. (2010) Novel Antibody Vectors for Imaging. *Semin Nucl Med* 40 (3): 167-181
- Oliveira S., Van Dongen G. A., Stigter-van Walsum M., Roovers R. C., Stam J. C., Mali W., Van Diest P. J., Van Bergen en Henegouwen P. M. (2012) Rapid visualization of human tumor xenografts through optical imaging with a near-infrared fluorescent anti-epidermal growth factor receptor nanobody. *Mol Imaging* 11 (1): 33-46

- Oyen D., Srinivasan V., Steyaert J., Barlow J. N. (2011) Constraining enzyme conformational change by an antibody leads to hyperbolic inhibition. *J Mol Biol* 407: 138–148
- Pardon E., Laeremans T., Triest S., Rasmussen S. G. F., Wohlkönig A., Ruf A., Muyldermans S., Hol W. G. J., Kobilka B. K., Steyaert J. (2014) A general protocol for the generation of Nanobodies for structural biology. *Nat Protoc* 9: 674–693
- Pavon E. J., Munoz P., Navarro M. D., Raya-Alvarez E., Callejas-Rubio J. L., Navarro-Pelayo F., Ortego-Centeno N., Sancho J., Zubiaur M. (2006) Increased association of CD38 with lipid rafts in T cells from patients with systemic lupus erythematosus and in activated normal T cells. *Mol Immunol* 43 (7): 1029-1039
- Pawluczko wyc A. W., Beurskens F. J., Beum P. V., Lindorfer M. A., Van de Winkel J. G. J., Parren P. W. H. I., Taylor R. P. (2009) Binding of Submaximal C1q Promotes Complement Dependent Cytotoxicity (CDC) of B Cells Opsonized with Anti-CD20 mAbs Ofatumumab (OFA) or Rituximab (RTX): Considerably Higher Levels of CDC Are Induced by OFA than by RTX. *J Immunol* 183: 749-758
- Perez J. M., Renisio J. G., Prompers J. J., Van Platerink C. J., Cambillau C., Darbon H., Frenken L. G. (2001) Thermal unfolding of a llama antibody fragment: a two-state reversible process. *Biochemistry* 40 (1): 74-83
- Perraud A. L., Fleig A., Dunn C. A., Bagley L. A., Launay P., Schmitz C., Stokes A. J., Zhu Q., Bessman M. J., Penner R., Kinet J. P., Scharenberg A. M. (2001) ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology. *Nature* 411 (6837): 595-599
- Petropoulos K. (2012) Phage display. *Methods Mol Biol* 901: 33–51
- Phipps C., Chen Y., Gopalakrishnan S., Tan D. (2015) Daratumumab and its potential in the treatment of multiple myeloma: overview of the preclinical and clinical development. *Ther Adv Hematol.* 6 (3):120-127.
- Plesner T., Lokhorst H., Gimsing P., Nahi H., Lisby S., Richardson P. G. (2012) Daratumumab, a CD38 monoclonal antibody in patients with multiple myeloma – data from a dose-escalation phase I/II study. *Blood* 120 (21) (Abstract 73)
- Quarona V., Zaccarello G., Chillemi A., Brunetti E., Singh V. K., Ferrero E., Funaro A., Horenstein A. L., Malavasi F. (2013) CD38 and CD157: a long journey from activation markers to multifunctional molecules. *Cytometry B Clin Cytom* 84 (4): 207-217
- Quarona V., Ferri V., Chillemi A., Bolzoni M., Mancini C., Zaccarello G., Roato I., Morandi F., Marimpietri D., Faccani G., Martella E., Pistoia V., Giuliani N., Horenstein A. L., Malavasi F. (2014) Unraveling the contribution of ectoenzymes to myeloma life and survival in the bone marrow niche. *Ann N Y Acad Sci* 1335: 10-22

- Reddy S., Robinson M. K. (2010) Immuno-positron emission Tomography in cancer models. *Semin Nucl Med* 40 (3): 182-189
- Reverts H., De Baetselier P., Muyldermans S. (2005) Nanobodies as novel agents for cancer therapy. *Expert Opin Biol Ther* 5(1):111-24
- Rothbauer U., Zolghadr K., Tillib S., Nowak D., Schermelleh L., Gahl A., Backmann N., Conrath K., Muyldermans S., Cardoso M. C., Leonhardt H. (2006) Targeting and tracing antigens in live cells with fluorescent nanobodies. *Nat Methods* 3: 887–889
- Sarker S. A., Jäkel M., Sultana S., Alam N. H., Bardhan P. K., Chisti M. J., Salam M. A., Theis W., Hammarström L., Frenken L. G. J. (2013) Anti-rotavirus protein reduces stool output in infants with diarrhea: a randomized placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 145: 740–748.e8
- Sauer C., Montag C., Wörner C., Kirsch P., Reuter M. (2012) Effects of a common variant in the CD38 gene on social processing in an oxytocin challenge study: possible links to autism. *Neuropsychopharmacology* 37 (6): 1474-1482
- Schirrmann T., Büssow K. (2010) Transient Production of scFv-FC Fusion Proteins in Mammalian Cells. In: Kontermann R., Dübel S. (Eds.) *Antibody Engineering Vol. 2*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 2010. 387-398
- Schofield D. J., Pope A. R., Clementel V., Buckell J., Chapple S. D. J., Clarke K. F., Conquer J. S., Crofts A. M., Crowther S. R. E., Dyson M. R., Flack G., Griffin G. J., Hooks Y., Howat W. J., Kolb-Kokocinski A., Kunze S., Martin C. D., Maslen G. L., Mitchell J. N., O'Sullivan M., Perera R. L., Roake W., Shadbolt S. P., Vincent K. J., Warford A., Wilson W. E., Xie J., Young J. L., McCafferty J. (2007) Application of phage display to high throughput antibody generation and characterization. *Genome Biology* 8: R 254
- Schuber, F., Lund, F. E. (2004) Structure and enzymology of ADP-Ribosyl cyclases: Conserved enzymes that produce multiple calcium mobilizing metabolites. *Curr Mol Med* 4, 249 - 261
- Seidel U. J. E., Schlegel P., Lang P. (2013) Natural killer cell mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in tumor immunotherapy with therapeutic antibodies. *Front Immunol* 4: 76
- Shan D., Ledbetter J. A., Press O. W. (1998) Apoptosis of malignant human B cells by ligation of CD20 with monoclonal antibodies. *Blood* 91 (5): 1644-1652
- Sherbenou D. W., Behrens C. R., Su Y., Wolf J. L., Martin III T. G., Liu B. (2014) The development of potential antibody-based therapies for myeloma. *Blood Rev* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.blre.2014.09.011>

- Sonnen A. F.-P., Henneke P. (2014) Structural biology of the membrane attack complex. In: Anderluh G., Gilbert R. MACPF/CDC proteins- agents of defense, attack and invasion. Springer Media Dordrecht
- Stanley H. F., Kadwell M., Wheeler J. C. (1994) Molecular evolution of the family Camelidae: a mitochondrial DNA study. *Proc Biol Sci.* 256(1345):1-6
- States D. J., Walseth T. F., Lee H. C. (1992) Similarities in amino acid sequences of Aplysia ADP-ribosyl cyclase and human lymphocyte antigen CD38. *Trends Biochem Sci* 17: 495
- Stevenson G. T. (2006) CD38 as a therapeutic target. *Mol Med* 12 (11-12): 345-346
- Stijlemans B., Conrath K., Cortez-Retamozo V., Van Xong H., Wyns L., Senter P., Revets H., De Baetselier P., Muyldermans S., Magez S. (2004) Efficient targeting of conserved cryptic epitopes of infectious agents by single domain antibodies. African trypanosomes as paradigm. *J Biol Chem* 279: 1256–1261
- Tang Y., Jiang N., Parakh C., Hilvert D. (1996) Selection of linkers for a catalytic singlechain antibody using phage display technology. *J Biol Chem* 271: 15682–15686
- Tang Z., Feng M., Gao W., Phung Y., Chen W., Chaudhary A., St. Croix B., Qian M., Dimitrov D. S., Ho M. (2013) A human single-domain antibody elicits potent antitumor activity by targeting an epitope in mesothelin close to the cancer cell surface. *Mol Cancer Ther* 12 (4): 416-426
- Terwisscha van Scheltinga A. G. T., Van Dam G. T., Nagengast W. B., Ntziachristos V., Hollema H., Herek J. L., Schröder C. P., Kosterink J. G. W., Lub-de Hoog M. N., De Vries E. G. E. (2011) Intraoperative near-infrared fluorescence tumor imaging with vascular endothelial growth factor and human epidermal growth factor receptor 2 targeting antibodies. *J Nucl Med* 52:1778–1785
- Tesar M. (2007) Fully human antibody MOR202 against CD38 for the treatment of multiple myeloma and other blood-borne malignancies. *J Clin Oncol* 25: 8106
- Tijink B. M., Laeremans T., Budde M., Stigter-van Walsum M., Dreier T., De Haard H. J., Leemans C. R., Van Dongen G. A. M. S. (2008) Improved tumor targeting of anti-epidermal growth factor receptor Nanobodies through albumin binding: taking advantage of modular Nanobody technology. *Mol Cancer Ther* 7: 2288–2297
- Unger, M. (2012) Klonierung und molekulare Charakterisierung von Einzeldomänen-Antikörpern gegen das membranständige Ekto-Enzym CD38 aus Homo Sapiens und gegen Toxine aus Clostridium difficile. Dissertation, Universität Hamburg, MIN-Fakultät
- Unger M., Eichhoff A. E., Schumacher L., Stryio M., Menzel S., Schwan C., Alzogaray V., Zylberman V., Seman M., Brandner J., Rohde H., Zhu K., Haag F., Mittrücker H.-W.,

- Goldbaum F., Aktories K., Koch-Nolte F. (2014) Selection of Nanobodies that block the enzymatic and cytotoxic activities of the binary *Clostridium Difficile* toxin CDT. *Sci Rep* 5, 7850; DOI:10.1038/srep07850 (2015)
- Vaisitti T., Aydin S., Rossi D., Cottino F., Bergui L., D`Arena G., Bonello L., Horenstein A. L., Brennan P., Pepper C., Gaidano G., Malavasi F., Deaglio S. (2010) CD38 increases CXCL 12-mediated signals and homing of chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* 24 (5): 958-969
- Vaisitti T., Audrito V., Serra S., Buonincontri R., Sociali G., Mannino E., Pagnani A., Zucchetto A., Tissino E., Vitale C., Coscia M., Usai C., Pepper C., Gattei V., Bruzzone S., Deaglio S. (2014) The enzymatic activities of CD38 enhance CLL growth and trafficking: implications for therapeutic targeting. *Leukemia* Jul 3 [Epub ahead of print]
- Vandenbroucke K., De Haard H., Beirnaert E., Dreier T., Lauwereys M., Huyck L., Van Huysse J., Demetter P., Steidler L., Remaut E., Cuvelier C., Rottiers P. (2010) Orally administered *L. lactis* secreting an anti-TNF Nanobody demonstrate efficacy in chronic colitis. *Mucosal Immunol* 3: 49–56
- Van der Linden R. H. J., Frenken L. G. J., De Geus B., Harmsen M. M., Ruuls R. C., Stok W., De Ron L., Wilson S., Davis P., Verrips C. T. (1999) Comparison of physical chemical properties of llama VHH antibody fragments and mouse monoclonal antibodies. *Biochim Biophys Acta* 1431 (1): 37-46
- Van der Linden R., De Geus B., Stok W., Bos W., Van Wassenaar D., Verrips T., Frenken L. (2000) Induction of immune responses and molecular cloning of the heavy chain antibody repertoire of Lama glama. *J Immunol Methods* 240: 185–195
- Van der Veer M. S., De Weers M., Van Kessel B., Bakker J. M., Wittebol S., Parren P. W. H. I., Lokhorst H. M., Mutis T. (2011a) Towards effective immunotherapy of myeloma: enhanced elimination of myeloma cells by combination of lenalidomide with the human CD38 monoclonal antibody daratumumab. *Haematologica* 2011, 96 (2): 284-290
- Van der Veer M. S., De Weers M., Van Kessel B., Bakker J. M., Wittebol S., Parren P. W. H. I., Lokhorst H. M., Mutis T. (2011) The therapeutic human CD38 antibody daratumumab improves the anti-myeloma effect of newly emerging multi-drug therapies. *Blood Cancer J* 1(10), e41
- Van Meerten T., Van Rijn R. S., Hol S., Hagenbeek A., Ebeling S. B. (2006) Complement-induced cell death by rituximab depends on CD20 expression level and acts complementary to antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Clin Cancer Res* 12: 4027-4035

- Verfaillie C. M., Miller J. S. (1994) CD34+/CD33-cells reselected from macrophage inflammatory protein 1 alpha+interleukin-3—supplemented „stroma-noncontact“ cultures are highly enriched for long-term bone marrow culture initiating cells. *Blood* 84 (5): 1442-1449
- Vidarsson G., Dekkers G., Rispens T. (2014) IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol* 5: 520
- Vincke C., Gutiérrez C., Wernery U., Devoogdt N., Hassanzadeh-Ghassabeh G., Muyldermans S. (2012) Generation of single domain antibody fragments derived from camelids and generation of manifold constructs. *Methods Mol Biol* 907: 145–176
- Waldmann T. A. (2003) Immunotherapy in past, present and future. *Nat Med* 9 (3): 269-277
- Wesolowski J. (2006) Klonierung und Mutagenese von rekombinanten Einzeldomänen-Antikörpern von Lama und Kaninchen. Diplomarbeit, Universität Hamburg, MINFakultät
- Wesolowski J, Alzogaray V, Reyelt J, Unger M, Juarez K, Urrutia M, Cauerhff A, Danquah W, Rissiek B, Scheuplein F, Schwarz N, Adriouch S, Boyer O, Seman M, Licea A, Serreze DV, Goldbaum FA, Haag F, Koch-Nolte F. (2009) Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Med Microbiol Immunol*. 198(3):157-74
- Wu A. M, Senter P. D. (2005) Arming antibodies: prospects and challenges for immunoconjugates. *Nat Biotechnol* 23 (9): 1137-1146
- Wu A. M., Olafsen T. (2008) Antibodies for Molecular Imaging of Cancer. *Cancer J* 14(3): 191–197
- Wu A. M (2009) Antibodies and antimatter: the resurgence of immuno-PET. *J Nucl Med* 50 (1): 2-5
- Young G. S., Choleris E., Lund F. E., Kirkland J. B. (2006) Decreased cADPR and increased NAD⁺ in the CD38^{-/-} mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 346 (1): 188-192
- Zhang H. M., Graeff R., Chen Z., Zhang L. H., Lee H. C. (2011) Dynamic conformations of the CD38-mediated NAD cyclization captured in a single crystal. *J Mol Biol* 405 (4):1070-1078.
- Zhang J., MacKenzie R., Durocher Y. (2009) Production of chimeric heavy-chain antibodies. *Methods Mol Biol*. 525:323-36
- Zhao Y. J., Lam C. M. C., Lee H. C. (2012) The membrane-bound enzyme CD38 exists in two opposing orientations. *Sci Signal* 5 (241) ra67
- Zhou X., Hu W., Qin X. (2008) The role of complement in the mechanism of action of Rituximab for B-cell lymphoma: Implications for therapy. *The Oncologist* 13: 954-966

- Ziller F., Marcor P., Bulla R., Sblattero D., Marzari R., Tedesco F. (2005) Controlling complement resistance in cancer by using human monoclonal antibodies that neutralize complement-regulatory proteins CD55 and CD59. *Eur J Immunol* 35 (7): 2175-2183
- Zolghadr K., Gregor J., Leonhardt H., Rothbauer U. (2012) Case study on live cell apoptosis-assay using lamin-chromobody cell-lines for high-content analysis. *Methods Mol Biol* 911: 569–575
- Zucchetto A., Benedetti D., Tripodo C., Bomben R., Dal Bo M., Marconi D., Bossi F., Lorenzon D., Degan M., Rossi F. M., Bulian P., Franco V., Del Poeta G., Deaglio S., Gaidano G., Tedesco F., Malavasi F., Gattei V. (2009) CD38/CD31, the CCL3 and CCL4 chemokines, and CD49d/vascular cell adhesion molecule-1 are interchained by sequential events sustaining chronic lymphocytic leukemia cell survival. *Cancer Res* 69 (9): 4001-4009
- Zucchetto A., Vaisitti T., Benedetti D., Tissino E., Bertagnolo V., Rossi D., Bomben R., Dal Bo M., Del Principe M. I., Gorgone A., Pozzata G., Gaidano G., Del Poeta G., Malavasi F., Deaglio S., Gattei V. (2012) The CD49d/CD29 complex is physically and functionally associated with CD38 in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* 26 (6): 1301-1312

Abkürzungsverzeichnis

2xYT	2-fach Hefeextrakt + Typton (2x yeast extract + tryptone)
6xHIS	Hexa-Histidin
Abb.	Abbildung
ADCC	Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (antibody dependent cellular cytotoxicity)
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ADPR	ADP-Ribose
ADPRP	ADP-Ribose-2`-Phosphat
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)benzensulfonylfluorid
AK	Antikörper
AMP	Adenosinmonophosphat
APC	Allophyocyanin
ART	ADP-Ribosyltransferase
ARTC	ADP-Ribosyltransferase mit R-S-E Motiv (C2/C3-Familie)
AS	Aminosäure
Asp	Asparaginsäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATRA	all-trans Retinsäure
BCR	B-Zell-Rezeptor
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
°C	Grad Celsius
cADPR	zyklische ADP-Ribose
Carb	Carbenicillin
CD	Unterscheidungsgruppen immunphänotypischer Oberflächenmerkmale (cluster of differentiation)
CDC	Komplementabhängige Zytolyse (complement dependent cytolysis)
CDCC	Komplementabhängige zellvermittelte Zytolyse (complement dependent cellular cytolysis)
cDNA	komplementäre DNA (complementary DNA)
CDR	complementarity determining region
CFU	koloniebildende Einheit (colony forming unit)
CH	constant heavy domain
CLL	chronisch lymphatische Leukämie
CXCL	CXC-Motiv Chemokin

CXCR	CXC-Motiv Chemokin Rezeptor
Cys	Cystein
DC	dendritische Zelle
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMA	European medicines agency
et al.	et altera
e-NAD	Nicotinamid-1, N ⁶ -Etheno-Adenin-Dinucleotide
Fab	fragment antigen binding
FACS	Fluorescence-activated cell sorter
Fc	kristallisierbares Fragment (fragment crystallizable)
FcR	Fc-Rezeptor
FCS	Fötales Kälberserum (fetal calf serum)
FDA	food and drug administration
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FR	framework region
FSC	forward scatter
Fv	variables Fragment (fragment variable)
Glu	Glutaminsäure
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
hCD38	humanes CD38
hcAb	heavy chain antibody
HCl	Salzsäure
HEK	humane, embryonale Nierenzelllinie (human embryonic kidney)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinylethansulfonsäure
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMiDs	Immunmodulierenden Substanzen
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton

Abkürzungsverzeichnis

lac	Lactose
LB	Luria-Bertani
M	Molar
mAk	monoklonaler Antikörper
mCRP	membrane complement regulatory protein
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MFI	mean fluorescence intensity
MHC	major histocompatibility complex
min	Minuten (minutes)
MM	multiple Myelom
MRT	Magnetresonanztomografie
NAADP+	Nicotinsäure-Adenindinukleotid-Phosphat
NADP+	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NLC	nurse like cell
NK	Natürliche Killerzellen
OD	Optische Dichte
ORR	overall response rate
OT	Oxytocin
OTR	Oxytocin Rezeptor
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglycol
PEI	Polyethylenimin
pelB	Pectyl-Lyase B
PET	Positronen-Emissions-Tomografie
PI	Propidiumiodid
PPL	Periplasmalysat
PS	Phosphatidylserin
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
RPMI	Zellkulturmedium (aus dem Roswell Park Memorial Institut)
S	Sekunden

scFv	single chain variable fragment
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SLE	systemischer Lupus Erythematoses
SOC	super optimal broth
SPECT	single photon emission computed tomography
SSC	side scatter
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TCR	T-Zell-Rezeptor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp	Tryptophan
TRPM2	transient receptor potential cation channel member
Tween-20	Polyoxyethylen(20)-sorbitanmonolaurat
U	Unit
UV	Ultraviolett
Val	Valin
VH	variable schwere Kette (variable heavy chain)
VHH	variable heavy domain of heavy chain antibodies
VL	variable leichte Kette (variable light chain)

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und die aus fremden Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher keinem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Julia Koenigsdorf