

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik und Poliklinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie und Nuklear-
medizin

Prof. Dr. Peter Bannas

Genetische Modifikation von CD38-spezifischen Schwere-Ketten- Antikörpern zur Therapie des Multiplen Myeloms

Dissertation

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

vorgelegt von:

Jana Larissa Röckendorf

aus Hamburg

Hamburg 2024

Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 30.05.2024

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Peter Bannas

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Walter Fiedler

Inhaltsverzeichnis

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF	1
1 Einleitung	6
1.1 Das Multiple Myelom	6
1.1.1 Immuntherapie	7
1.1.2 Daratumumab	8
1.1.3 Tumormikromilieu	9
1.2 CD38	10
1.2.1 Aufbau und Struktur	10
1.2.2 Funktionen	12
1.3 Effektormechanismen	13
1.4 Schwere-Ketten-Antikörper	15
1.5 Die Zielsetzungen der Arbeit	19
2 Material	20
3 Methoden	26
3.1 Molekularbiologische Methoden	26
3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion	26
3.1.2 Restriktionsverdau und Dephosphorylierung des Vektorplasmids	27
3.1.3 Die Ligation von Vektor und Insert	28
3.1.4 Die Transformation in kompetente E. coli	28
3.1.5 Die Plasmidpräparation aus kompetenten E. coli	29
3.1.6 Die DNA-Sequenzierung	30
3.1.7 Agarosegel-Elektrophorese	30
3.2 Zellbiologische Methoden	31
3.2.1 Zellkultur	31
3.3 Proteinbiochemische Methoden	32
3.3.1 Die Produktion von Antikörpern durch Transfektion von HEK293-6E Zellen	32
3.3.2 Die Aufreinigung der Antikörper	33
3.3.3 Die Gelelektrophorese	33
3.3.4 Ein Fluoreszenzassay zur Messung der isolierten Cyclase-Aktivität	34
3.4 Immunologische Methoden	35

3.4.1	Expressionsanalyse	35
3.4.2	Der CDC-Assay	36
3.4.3	Der CDC-Assay mit Luciferase transduzierten LP-1 Zellen.....	36
3.4.4	Der C1q-Bindungsassay	37
4	Ergebnisse	38
4.1	Die Expressionsanalyse von Tumorzellen	38
4.2	Die Aktivierung der komplementvermittelten Zytolyse durch Schwere- Ketten-Antikörper	39
4.2.1	Monovalente hcAbs zeigen keine Aktivität bei der CDC, aber in einer Kombination erreichen sie eine hohe Effektivität.....	39
4.2.2	Die CD38-exprimierenden Tumorzelllinien unterscheiden sich in ihrer Sensitivität bei der CDC	40
4.2.3	Die Expression von CD55 und CD59 korreliert mit der Resistenz gegenüber der CDC.....	41
4.3	Aktivierung der CDC mit tetraivalenten und mutagenisierten Schwere- Ketten-Antikörpern	42
4.3.1	Biparatopische Schwere-Ketten-Antikörper weisen eine gute Effektivität bei der CDC auf	42
4.3.2	Biparatopische Schwere-Ketten-Antikörper mit 5GS-Linkerlänge weisen eine stärkere C1q-Bindung auf als Antikörper mit einer 15GS- und einer 20GS-Linkerlänge	44
4.3.3	Fc-Mutationen modulieren die Kapazität biparatopischer Schwere- Ketten-Antikörper bei der CDC	45
4.4	CD38-spezifische Schwere-Ketten-Antikörper inhibieren die GDPR- Cyclase-Aktivität von CD38.....	46
5	Diskussion.....	49
5.1	Die Effektivität bei der CDC hängt von der Expression von CD38, CD55 und CD59 ab	49
5.2	Die Modifikation biparatopischer Schwere-Ketten-Antikörper und ihre Effektivität bei der CDC	50
5.3	Modulation der GDPR-Cyclase-Aktivität von CD38 durch biparatopische Schwere-Ketten-Antikörper	53

5.4	Anwendungsperspektiven für biparatopische Schwere-Ketten-Antikörper ...	56
6	Zusammenfassung	58
7	Abstract	59
8	Anhang	60
8.1	Klonierungsstrategie	60
8.2	Plasmidkarten	61
8.3	DNA-Sequenzen tetravalenter Schwere-Ketten-Antikörper	62
8.4	DNA-Sequenzen der hlgG1 Fc-Varianten.....	63
	Abkürzungsverzeichnis	64
	Abbildungsverzeichnis	68
	Tabellenverzeichnis	70
	Literaturverzeichnis	71
	Danksagung	80
	Lebenslauf	81
	Eidesstattliche Erklärung	83

1 Einleitung

In der vorliegenden Arbeit wird die genetische Modifikation von biparatopischen Schwere-Ketten-Antikörpern (hcAbs) zur Verbesserung der Therapie des Multiplen Myeloms (MM) untersucht. Das MM ist eine hämatologische Erkrankung, bei der die Tumorzellen das Oberflächenprotein CD38 (cluster of differentiation 38) überexprimieren. Die Einleitung liefert einen Überblick zur Erkrankung MM. Dabei wird auch die Rolle von CD38 im Rahmen von hämatologischen Erkrankungen und für das Tumormilieu erläutert. Darüber hinaus wird auf den Aufbau von hcAbs und die Möglichkeiten einer genetischen Modifikation von CD38-spezifischen hcAbs eingegangen. In der Arbeit wurde in Zellexperimenten mit verschiedenen CD38-exprimierenden Tumorzellen überprüft, in wie weit genetisch modifizierte hcAbs eine komplementvermittelte Lyse induzieren können. Ebenfalls wurde untersucht, inwiefern die GDP-ase-Aktivität von CD38 durch die modifizierten hcAbs induziert oder inhibiert wird.

1.1 Das Multiple Myelom

Das MM ist eine hämato-onkologische Erkrankung, die zu den B-Zell Non-Hodkin-Lymphomen gehört (Donk et al., 2021). Das MM ist mit 6 Erkrankungen pro 100.000 Menschen pro Jahr die zweithäufigste hämatologische Krebserkrankungen in den westlichen Industriestaaten (Kazandjian, 2016). Bei dieser Erkrankung kommt es zu einer monoklonalen Vermehrung von Plasmazellen im Knochenmark (Fairfield et al., 2016). Folglich kann es zu einer Nierenschädigung, einer Knochenschädigung und einer Knochenmarksinsuffizienz kommen (Bridoux et al., 2021). Das MM bildet eine heterogene Gruppe von Erkrankungen der Plasmazellen, wodurch die Therapie der Erkrankung erschwert wird (Morgan et al., 2012; Rajkumar, 2019). In den letzten 15 Jahren wurde die Prognose von Patient:innen mit MM durch die Therapien mit monoklonalen Antikörpern und durch andere Immuntherapien maßgeblich verbessert (Kumar et al., 2008, 2017; Rajkumar, 2019). Kumar et. al konnten in einer Beobachtungsstudie mit 1038 Patient:innen nachweisen, dass die Personen, bei denen im Zeitraum 2001-2005 MM diagnostiziert wurde, ein medianes Überleben von 4,6 Jahren nach der Diagnosestellung hatten. Die Patient:innen, die im Zeitraum 2006-2010 diagnostiziert wurden, hatten bereits ein medianes Überleben von 6,1 Jahren. Durch den Einsatz von Daratumumab konnte eine signifikante Verbesserung des Überle-

bens erreicht werden (Kumar et al., 2014). Die Prognose von Patient:innen mit refraktärem MM und dabei insbesondere refraktär nach einer Therapie mit Proteasom-inhibitoren und Immunmodulatoren ist aber nach wie vor schlecht (Kumar et al., 2008; Harousseau, 2010). Für Patient:innen mit refraktärem MM konnte durch die Therapie mit dem CD38-spezifischen monoklonalen Antikörper Daratumumab ein signifikanter Überlebensvorteil erreicht werden (Kastritis et al., 2009; Moreau et al., 2021). Allerdings ist auch das mediane progressionsfreie Überleben von Patient:innen mit therapierefraktärem MM nach einer Therapie mit Daratumumab nur kurz. Mian et al. ermittelten in einer Studie mit 73 Patient:innen ein medianes progressionsfreies Überleben (PFS) von 15,8 Monaten. Die Rückfallrate ist also nach wie vor hoch, weshalb es erforderlich ist, weitere spezifische Immuntherapien zu entwickeln.

1.1.1 Immuntherapie

Immuntherapien helfen dem Immunsystem dabei, maligne Zellen zu bekämpfen, indem sie es stimulieren. Immunmodulatoren, wie Thalidomid, Lenalidomid und Pomalidomid, gehören wie die Proteasom-inhibitoren Bortezomib, Carfilzomib und Ixazomib zur älteren Klasse von Immuntherapeutika (Hayashi et al., 2005; Gandolfi et al., 2017; Abe and Ishida, 2019). Eine andere Klasse von Immuntherapeutika sind die monoklonalen Antikörper. Durch den Einsatz von monoklonalen Antikörpern konnten die Prognose und die Remissionsrate von Myelom-Patient:innen mit einem Rezidiv verbessert werden (Zanwar et al., 2020). Für die Therapie des MMs zugelassene monoklonale Antikörper sind aktuell der CD38-spezifische monoklonale Antikörper Daratumumab (Handelsname: Darzalex®), der CD38-spezifische monoklonale Antikörper Isatuximab (Handelsname Sarclisa®) und der SLAMF7-spezifische (signaling lymphocyte activation molecule, CD319) monoklonale Antikörper Elotuzumab (Handelsname: Emluciti®) (Chim et al., 2018). Die Antikörpertherapien werden bei Myelom-Patient:innen mit Rezidiven eingesetzt oder bei Patient:innen, die ungeeignet für eine Hochdosis-Chemotherapie mit einer späteren autologen Stammzell-Transplantation sind. Daratumumab ist für die Einzeltherapie zugelassen. Elotuzumab und Isatuximab sind für Kombinationstherapien mit Immunmodulatoren und Glucocorticoiden zugelassen (Basher et al., 2020). Eine weitere zugelassene Immuntherapie für therapierefraktäre und rezidierte Myelome ist die gegen die B-Zellen gerichtete Chimäre-Antigenrezeptor-T-Zell-Therapie (CAR-T-Zell-Therapie) mit Ide-

cabtagen vicleucel und Ciltacabtagen Autoleucel (S3-Leitlinie Multiples Myelom 2022, S.184). Bei diesen Therapien werden die T-Zellen mit einem Gen für eine Bindungsstelle gegen das B-Zell-Reifungsantigen BCMA ausgestattet. Dadurch können die CAR-T-Zellen an Myelom-Zellen binden, wodurch eine verstärkte Immunreaktion gegen sie ausgelöst wird (San-Miguel et al., 2023).

1.1.2 Daratumumab

Daratumumab ist ein CD38-spezifischer monoklonale Antikörper vom Immunglobulin Isotyp IgG1. Das Pharmaunternehmen Janssen lizenzierte Daratumumab im Jahr 2012. Daratumumab wird durch eine Immunisierung von transgenen Mäusen mit einem rekombinanten humanen CD38-Protein hergestellt. Die transgenen Mäuse verfügen dabei über Genloki für humane schwere und leichte Antikörperketten. Dadurch kann von den Mäusen nach der Immunisierung mit CD38 ein humaner monoklonale Antikörper produziert werden (Weers et al., 2011). Daratumumab wurde 2016 von der Europäischen Arzneimittelbehörde (EMA) für die Einzeltherapie des MMs zugelassen und zwar für Patient:innen, die mindestens drei Therapien mit Immunmodulatoren und Proteasominhibitoren erhalten haben und nach diesen Therapien refraktär waren (van de Donk et al., 2018). 2018 erhielt Daratumumab eine Zulassungserweiterung für die Erstlinientherapie in einer Kombination mit Bortezomib, Melphalan und Prednison für Patient:innen, die nicht geeignet für eine autologe Stammzell-Transplantation waren. Dadurch ist Daratumumab der erste zugelassene Antikörper für die First-Line-Therapie des MMs. Die multizentrische, randomisierte und kontrollierte Phase-III-Studie ALCYONE, in die insgesamt 706 Patient:innen mit einem neu diagnostizierten Multiplen Myelom eingeschlossen wurden, konnte bei einer Kombinationstherapie mit Daratumumab ein PFS von 71,7 % und bei einer Therapie mit Bortezomib, Melphalan und Prednison ein PFS von nur 50,5 % nach einem Beobachtungszeitraum von 18 Monaten nachweisen (Ayazpoor, 2018).

Daratumumab kann durch immunvermittelte Effektormechanismen zu einer Lyse der Zelle führen. Die Fc-abhängigen Effektormechanismen der antikörperabhängigen und zellvermittelten Zytotoxizität (ADCC), die komplementabhängige Zytolyse (CDC) und die antikörperabhängige zellvermittelte Phagozytose (ADCP), werden vom CD38-spezifischen monoklonalen Antikörper Daratumumab ausgelöst und führen zu einem Rückgang der Myelomlast (Weers et al., 2011; Krejcik et al., 2016). Neben

den CD38-positiven Myelom-Zellen gibt es auch Subpopulationen von Immunzellen, die ebenfalls CD38 exprimieren und im Knochenmark (KM) ein immunsuppressives Milieu erzeugen. Diese Subpopulationen werden aus T-regulatorischen Zellen (T-regs), B-regulatorischen Zellen (B-regs) und myeloiden Suppressorzellen (MDSC) gebildet. Durch Daratumumab können die Zahlen von T-regs, B-regs und MDSCs reduziert werden, wodurch es zu einer Zunahme von T-Helfer-Zellen (TH-Zellen) und zytotoxischen T-Zellen (Tc-Zellen) kommt. Dadurch kann das sogenannte immunsuppressive Tumormilieu zugunsten einer verbesserten antitumorösen Immunantwort verändert werden (Krejci et al., 2016). Daratumumab kann durch die Bindung an CD38 darüber hinaus auch die ecto-enzymatische Funktion des Oberflächenproteins inhibieren, die u. a. an der Bildung von Adenosin beteiligt ist. Die Bildung von Adenosin verläuft über Zwischenschritte, an denen mehrere Ektoenzyme beteiligt sind, wobei die Bildung von Adenosin in der sogenannten Knochenmarknische ebenfalls mit der Tumorprogression korreliert (Horenstein et al., 2016). Deshalb wird die Inhibition der Adenosinproduktion als weiterer Antitumormechanismus diskutiert (van de Donk and Usmani, 2018).

1.1.3 Tumormikromilieu

Die CD38-positiven Subpopulationen von T-regs, B-regs und MDSCs führen zusammen mit einer höheren Dichte von Adenosin-Rezeptoren (Adenosin-R) und bei höheren Adenosin-Konzentrationen zu einer Immundysfunktion im Tumormikromilieu (Krejci et al., 2016). Adenosin wird dabei durch die Ektoenzyme CD38, CD203a und CD73 synthetisiert. Sie katalysieren die Herstellung von Adenosin aus Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD^+) im immunsuppressiven Milieu (Costa et al., 2019). Durch das hypoxische Milieu im infiltrierten Knochenmark stellen die Myelom-Zellen ihren Stoffwechsel auf eine anaerobe Glykolyse um, wodurch die ATP-Konzentration abnimmt und die NAD^+ -Konzentration ansteigt. Durch die ansteigende NAD^+ -Konzentration wird wiederum verstärkt Adenosin produziert (Horenstein et al., 2016). Horenstein et al. haben die Adenosin-Konzentration in Knochenmark-Proben von MM-Patient:innen untersucht. Dabei zeigte sich, dass die gemessene Adenosin-Konzentration mit dem Krankheitsprogress und dem Stadium der Erkrankung korreliert. In den Proben von symptomatischen Patient:innen konnten signifikant höhere Adenosin-Konzentrationen nachgewiesen werden als in den Proben von symptomlosen Patient:innen (Horenstein et al., 2016). Deshalb wird in der vorliegenden Arbeit

untersucht, inwiefern CD38-spezifische hcAbs die Cyclase-Aktivität von CD38 und damit die Synthese von Adenosin beeinflussen.

1.2 CD38

CD38 (**Abb. 1.1**) ist ein transmembranöses Ektoenzym mit unterschiedlichen Funktionen. Ihm kommt eine Schlüsselrolle bei der Metabolisierung von NAD^+ und bei der Homöostase des extrazellulären Nukleotidstoffwechsel und des intrazellulären Calciumspiegels zu (Hogan et al., 2019). CD38 kommt als ein Zelloberflächenprotein auf unterschiedlichen Immunzellen vor und wirkt sich auf Entzündungsprozesse, den Alterungsprozess und die Tumorgenese aus (Hogan et al., 2019). CD38 katalysiert zusammen mit den Ektoenzymen CD203a und CD73 die Umwandlung von NAD^+ in Adenosin. NAD^+ wird z. B. vermehrt von geschädigten Zellen freigesetzt (Bannas and Koch-Nolte, 2018; Morandi et al., 2018).

CD38 wird wie bereits erwähnt auf der Oberfläche von verschiedenen Immunzellen exprimiert. Dazu gehören B-Zellen, Neutrophile Granulozyten, Natürliche Killerzellen, T-regulatorische Zellen und myeloische Zellen (Piedra-Quintero et al., 2020). Auf mehreren hämato-onkologischen Tumoren wird es verstärkt exprimiert. Auch beim Plasmazelltumor Multiples Myelom wird CD38 überexprimiert, weshalb es ein attraktives und interessantes Ziel-Antigen darstellt (Schütze et al., 2018).

1.2.1 Aufbau und Struktur

CD38 (**Abb. 1.1**) ist ein 46 Kilodalton (kDa) großes Transmembranprotein vom Typ II. Typ II bezieht sich darauf, dass der C-Terminus extrazellulär lokalisiert ist (Liu et al., 2005, Königsdorf, 2016). Die lange extrazelluläre C-terminale Domäne von CD38 besteht aus 258 Aminosäuren. Die transmembranäre und die zytosolische Domäne umfassen jeweils 21 Aminosäuren und sind daher deutlich kürzer (Malavasi et al., 1994; Donk et al., 2016).

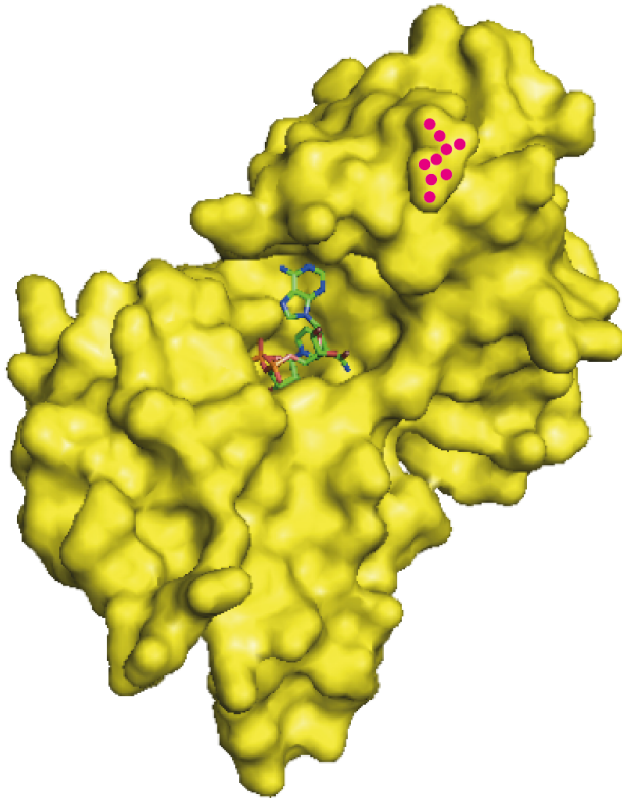


Abbildung 1.1: 3D-Struktur des Ektoenzym CD38. CD38 verfügt über eine lange extrazelluläre C-terminale (rosa Punkte) Domäne. In seinem aktiven Zentrum bindet CD38 NAD^+ . Die Grafik wurde mit der 3D-Grafiksoftware PyMol anhand der Daten des Enzyms CD38 in einem Komplex mit NAD^+ erstellt (PDB Code: 7dua (Daratumumab)).

In den Vorarbeiten wurde in Kreuzblockade-Assays drei nicht überlappende Epitope von CD38 (**Abb. 1.2**) identifiziert (Fumey et al., 2017). Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Nanobody JK2 bindet wie der Nanobody 523 an das Epitop 2 (E2). Der Nanobody JK36 bindet wie das Fab-Fragment von Isatuximab an das Epitop 3 (E3). Der monoklonale Antikörper Daratumumab bindet wie der Nanobody 375 an das Epitop 1 (E1) (**Abb. 1.2**).

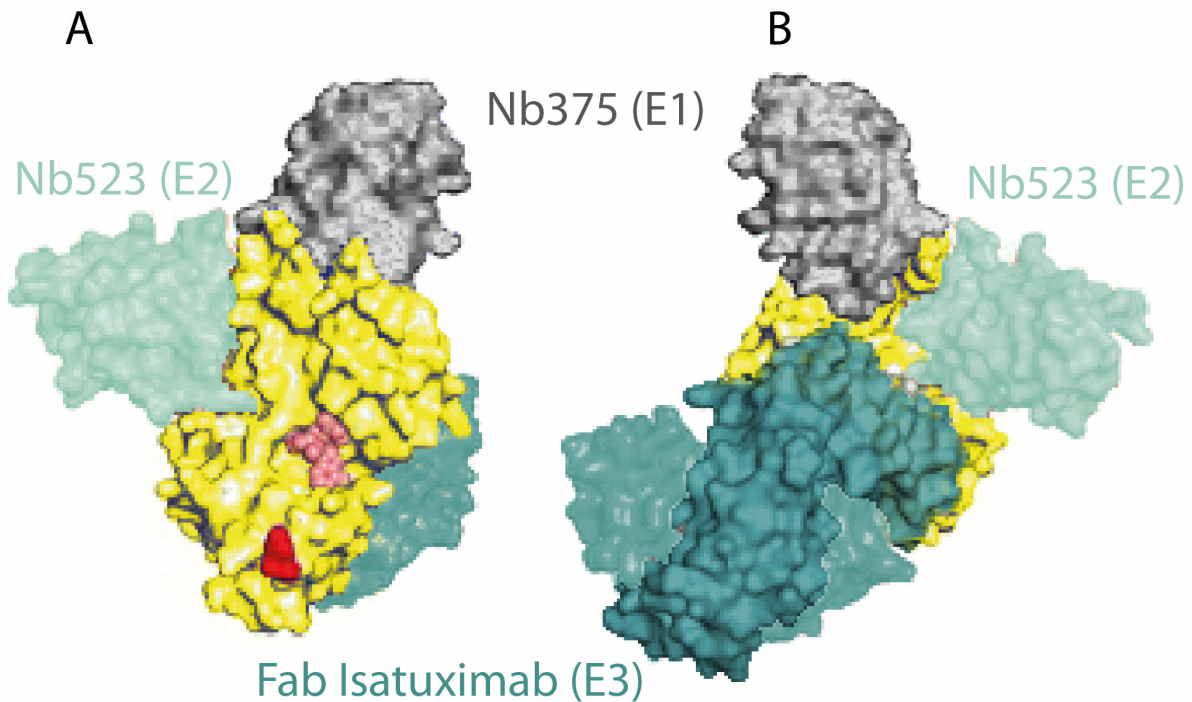


Abbildung 1.2: Die extrazelluläre Domäne von CD38 verfügt über drei nicht überlap-pende Epitope. Die extrazelluläre Domäne von CD38 wurde als dreidimensionales Modell dargestellt. CD38 besitzt drei Epitope, die hier von drei Antikörpern gebunden werden, die jeweils nur an ein Epitop binden. Der Nanobody 375 (Nb 375) bindet an das Epitop 1 (E1). Der Nanobody 523 (Nb 523) bindet an das Epitop 2 (E2). Das Fab-Fragment von Isatuximab (Fab Isatuximab) bindet an das Epitop 3 (E3). Der in dieser Arbeit verwendete monoklonale Antikörper Daratumumab würde an E1, der Nanobody JK2 an E2 und der Nanobody JK36 an E3 binden (Fumey et al., 2017). Im versteckten aktiven Zentrum des Enzyms wird NAD^+ gebunden (rosa). (A) CD38 vom N-Terminus (rot) aus betrachtet; (B) CD38 vom C-Terminus aus betrachtet; Die Grafik wurde mit der 3D-Grafiksoftware PyMol anhand der Daten des Enzyms CD38 in einem Komplex mit NAD^+ und anhand der Daten der Protein Data Bank generiert (PDB Codes: 5f21 (Nanobody 375), 5f10 (Nanobody 523), 4cmh (Isatuximab)).

1.2.2 Funktionen

NAD^+ und ATP werden von Zellen als sogenannte „Danger“-Signale freigesetzt (Haag et al., 2007). Extrazelluläres NAD^+ kann durch die Ektoenzyme CD38, CD203 und CD73 in einer gemeinsamen Kaskade zu Adenosin (**Abb.1.3**) umgesetzt werden (Horenstein et al., 2020). CD38 hydrolysiert bei einem physiologischen pH-Wert 90 % des NAD^+ zu ADPR und zyklisiert 2 % des NAD^+ zu cADPR (Malavasi et al., 1994; Horenstein et al., 2020). cADPR kann durch CD38 mittels Hydrolyse wiederum zu ADPR konvertiert werden. ADPR wird durch CD203 in Phosphoribosid und Adenosinmonophosphat gespalten (AMP). AMP kann dann wiederum durch CD73 zu Adenosin (**Abb.1.3**) umgesetzt werden (Menzel et al., 2018). Adenosin bindet an den A2A-Adenosin-Rezeptor (Adora2a-R) von T-Zellen, Makrophagen und NK-Zellen. Durch die Bindung an den Adora2a-R kommt es zu einem anti-inflammatorischen

Signal, was im Tumormilieu zu einer immunsuppressiven Wirkung führt (Menzel et al., 2018). Außerdem kommt es zu einer verminderten Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine Interleukin-2 (IL-2) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) (Leone and Emens, 2018).

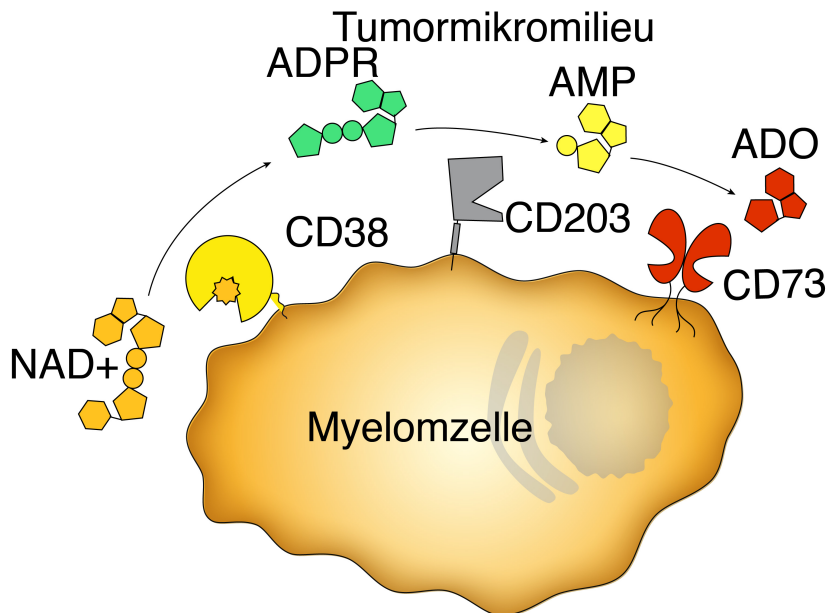


Abbildung 1.3: CD38 katalysiert zusammen mit den Ektoenzymen CD203 und CD73 im Tumormikromilieu die Synthese von immunsuppressivem Adenosin aus Nikotinadenindinukleotid (NAD⁺). CD38 konvertiert NAD⁺ zu ADPR. ADPR wird durch CD203 zu AMP umgesetzt, aus dem dann durch CD73 Adenosin gebildet wird. Adenosin verfügt im Tumormikromilieu über eine immunsuppressive Wirkung. Die Grafik wurde von Julia Ham-bach erstellt und teilweise verändert (Baum et al., 2021).

Humanes CD38 verfügt sowohl über eine Cyclase- als auch eine Hydrolase-Aktivität und zwar in einem Verhältnis von 1:99. Die isolierte Cyclase-Aktivität von CD38 wurde in dieser Arbeit in einem Fluoreszenzassay gemessen.

1.3 Effektormechanismen

Durch die Bindung eines Antikörpers an die Tumorzelle kann es zu einer komplexvermittelten Zytolyse (CDC) (**Abb.1.4**), einer antikörperabhängigen und zellvermittelten Zytotoxizität (ADCC) oder einer antikörperabhängigen Phagozytose (ADPC) kommen (Böldicke, 2021, Donk et al., 2016). Die ADCC wird durch eine Bindung von Effektorzellen wie NK-Zellen an den Fc-Teil eines Antikörpers ausgelöst, wodurch dann durch eine Ausschüttung von Perforinen und Granzymen eine Lyse der Zelle

ausgelöst werden kann (Hambach et al., 2020). Bei der ADCP kommt es durch die Bindung des Fc-R von Makrophagen an den Fc-Teil eines Antikörpers zur Phagozytose der Tumorzelle (Donk et al., 2016).

Die komplementvermittelte Zytolyse (CDC) wird durch die Bindung des Antikörpers an das Antigen und eine sich anschließende Aktivierung der Komplementkaskase ausgelöst (**Abb. 1.4.**). Durch Bindung der Antikörper an die Tumorzelle können sich die Fc-Teile zusammenlagern, sodass sich der hexamere C1-Komplex an die Fc-Domäne binden kann.

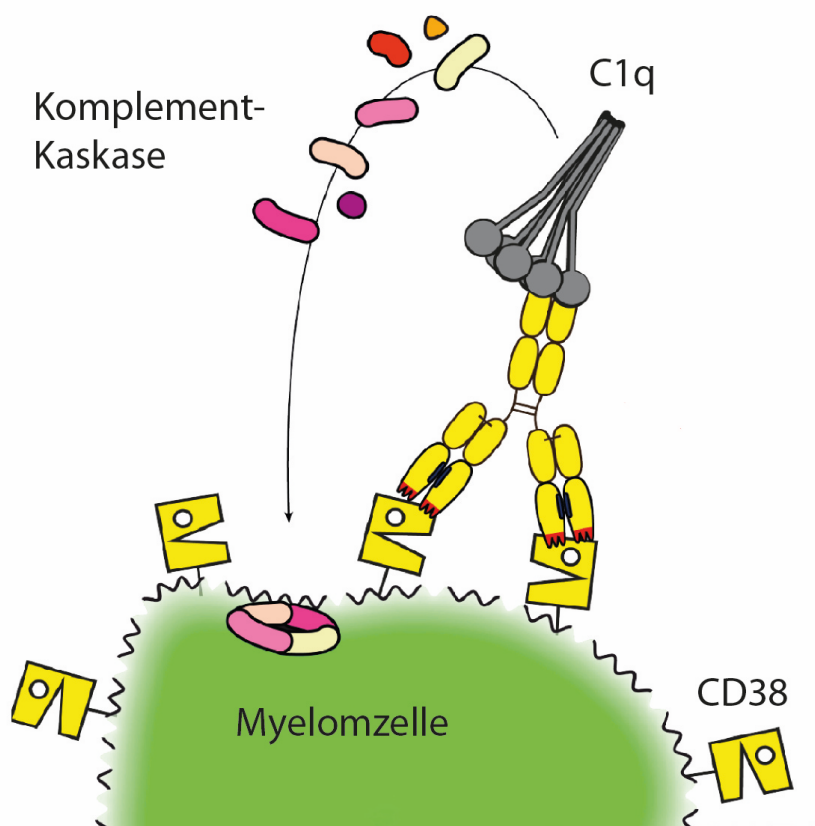


Abbildung 1.4: Die komplementvermittelte Zytotoxizität (CDC) ist ein Fc-abhängiger Effektormechanismus. Durch die Bindung eines CD38-spezifischen Antikörpers an CD38 auf der Myelom-Zelle und die Bindung von C1q an den Fc-Teil kann der hexamere C1-Komplex gebildet werden. Die Bildung des C1-Komplexes führt zur Aktivierung der Komplementkaskade. Die mit Adobe Illustrator gestaltete Grafik wurde von Julia Hambach erstellt und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

C1q ist der erste Faktor in der Komplementkaskade. Durch die Bindung von C1q an die Fc-Domäne eines IgG- oder IgM-Antikörpers wird der klassische Weg der Komplementkaskade aktiviert (Schütze 2021, S.4). Dabei bildet sich der hexamere C1-Komplex. Der C1-Komplex ist dann der Ausgangspunkt für den klassischen Weg.

Durch die Bildung des C1-Komplexes kommt es zur Auslösung der Komplementkaskade und schließlich zur Bildung des Membranangriffskomplexes (MAC) (Sonnen et al., 2014). Nach der Bildung des MACs und der Formation einer Pore in der Zellmembran kommt es dann zur Lyse der Tumorzelle (Müller-Esterl, 2011) (**Abb. 1.4**).

1.4 Schwere-Ketten-Antikörper

Schwere-Ketten-Antikörper (hcAbs) unterscheiden sich in ihrem Aufbau von konventionellen Antikörpern. Sie verfügen im Unterschied zu konventionellen Antikörpern (**Abb. 1.5A**), die aus zwei leichten und zwei schweren Ketten bestehen, nur über zwei schwere Ketten (Fumey 2021, S.10). hcAbs (**Abb. 1.5B**) kommen natürlicherweise in Lamas und Kameliden vor. Nanobodies (**Abb. 1.5C**), die auch als Einzeldomänen-Antikörper (V_HH) bezeichnet werden, bestehen aus der antigenbindenden Domäne eines hcAbs und kommen ebenfalls wie die hcAbs natürlicherweise nur in Kameliden vor (Bannas and Koch-Nolte, 2018).

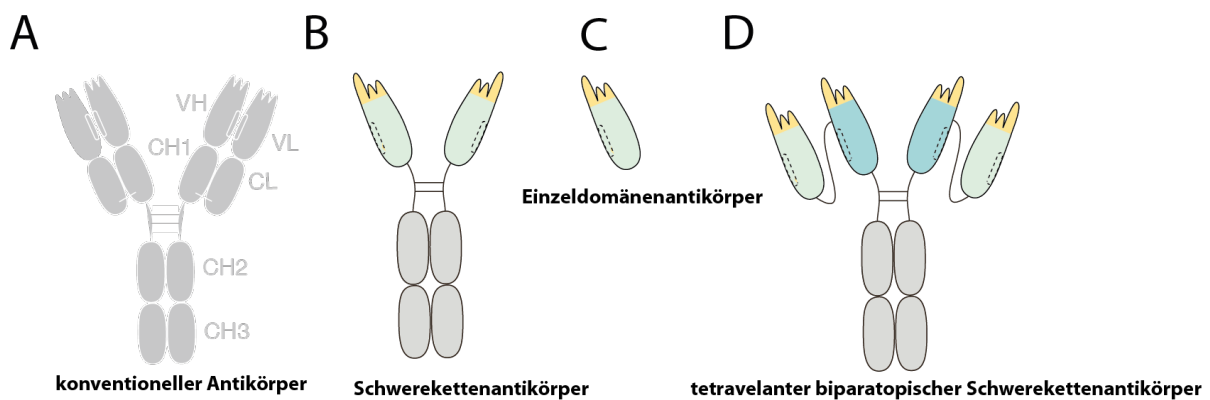


Abbildung 1.5: Schwere-Ketten-Antikörper bestehen im Unterschied zu konventionellen Antikörpern nur aus zwei schweren Ketten. (A) Konventioneller CD38-spezifischer humaner monoklonaler IgG1-Antikörper mit zwei schweren und zwei leichten Ketten. Die beiden schweren Ketten sind an der Gelenkregion über zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden. Die konstante Region der leichten Kette (CL) ist über eine Disulfidbrücke mit der CH1-Region der schweren Kette verbunden. Zwischen der variablen Domäne der leichten Kette (VL) und der variablen Domäne der schweren Kette (VH), die zusammen das antigenbindende Fragment (Fab) des Antikörpers bilden, gibt es eine hydrophile Schnittstelle. (B) Ein CD38-spezifischer humanisierter und bivalenter Schwere-Ketten-Antikörper mit zwei antigenbindenden Einzeldomänen-Antikörpern und einem humanen Fc-Teil, dessen CH2-Region über die Hinge-Region mit den Einzeldomänen-Antikörpern verbunden ist. (C) Ein Einzeldomänen-Antikörper besteht lediglich aus der variablen Domäne eines hcAbs. (D) Ein biparatopischer Schwere-Ketten-Antikörper, der über vier antigenbindende Einzeldomänen-Antikörper verfügt und an zwei verschiedene Epitope bindet (Bannas and Koch-Nolte, 2018; Schütze et al., 2018; Fumey 2021, S.10).

Der Nanobody kann über die Hinge-Region mit der CH2- und CH3-Domäne eines humanen IgG1 fusioniert werden. Dadurch entsteht ein chimärer lama/humaner hcAb (Bannas and Koch-Nolte, 2018) (**Abb. 1.5**). hcAbs bieten einige Vorteile gegenüber konventionellen Antikörpern (Schütze 2021, S.68). Ein Vorteil besteht darin, dass hcAbs genetisch leichter hergestellt und modifiziert werden können als konventionelle Antikörper. Dadurch können etwa auch biparatopische hcAbs hergestellt werden (**Abb.1.5D**). hcAbs haben ein geringeres Molekulargewicht und können dadurch die Gewebe besser penetrieren (Fumey et al., 2017). Bivalente hcAbs haben ein Molekulargewicht von ca. 75 kDa (**Abb.1.7**). Monoklonale Antikörper weisen bereits ein Molekulargewicht von ca. 150 kDa auf (**Abb. 1.7**) (Ma and O’Kennedy, 2015). Die hypervariable Region von Nanobodies (**Abb.1.5B**), die auch als komplementaritätsbestimmende Region (CDR) bezeichnet wird, verfügt über eine lange Schleife in der CDR3. Durch diese fingerartige Konformation der CDR3 kann der hcAb leichter in Vertiefungen von katalytischen Zentren oder an andere höhlenartige Stellen binden, die für konventionelle Antikörper nicht zu erreichen sind (Bannas and Koch-Nolte, 2018; Baum et al., 2020). hcAbs haben nicht wie konventionelle Antikörper eine leichte und eine schwere Kette, die sich über hydrophile Wasserstoffbrückenbindungen zusammenlagern (Bannas and Koch-Nolte, 2018). Dadurch wird es erleichtert, hcAbs sowohl in eukaryotischen als auch in prokaryotischen Expressionssystemen zu produzieren (Asaadi et al., 2021).

Die Modifikation von hcAbs kann durch eine Variation der Nanobodies, eine Veränderung der Linkerlänge und Mutationen am Fc-Teil durchgeführt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden CD38-spezifische hcAbs anhand dieser drei Möglichkeiten modifiziert (**Abb. 1.6**) Grundlage war eine Bibliothek mit 22 CD38-spezifischen Nanobodies, die in der Arbeitsgruppe Nolte durch eine Immunisierung von Lamas mit rekombinatem CD38 hergestellt wurden (Fumey et al., 2017). Die Nanobody-Dimere (JK2-15GS-JK2, JK2-15GS-JK36, JK36-15GS-JK2) wurden bereits in Vorarbeiten von Niklas Schuster kloniert und zur Verfügung gestellt. Die Nanobody-Dimere wurden bei der Klonierung mit den Fc-Teilen von humanem IgG1 fusioniert. Auch L-15-hIgG1, JK2-hIgG1 und JK36-hIgG1 lagen bereits als Plasmidvektoren vor.

Die Anordnung der Nanobodies eines biparatopischen hcAbs kann variiert werden (**Abb. 1.6B***). Der Linker, der die Nanobodies verbindet, besteht aus der Aminosäureabfolge Gly-Gly-Gly-Ser. Auch die Linkerlänge der biparatopischen hcAbs (**Abb.**

1.6C) wurde verändert. Eine Veränderung der Linkerlänge wurde ebenfalls in Vorarbeiten an anderen Konstrukten getestet (Schuster 2021, S.35).

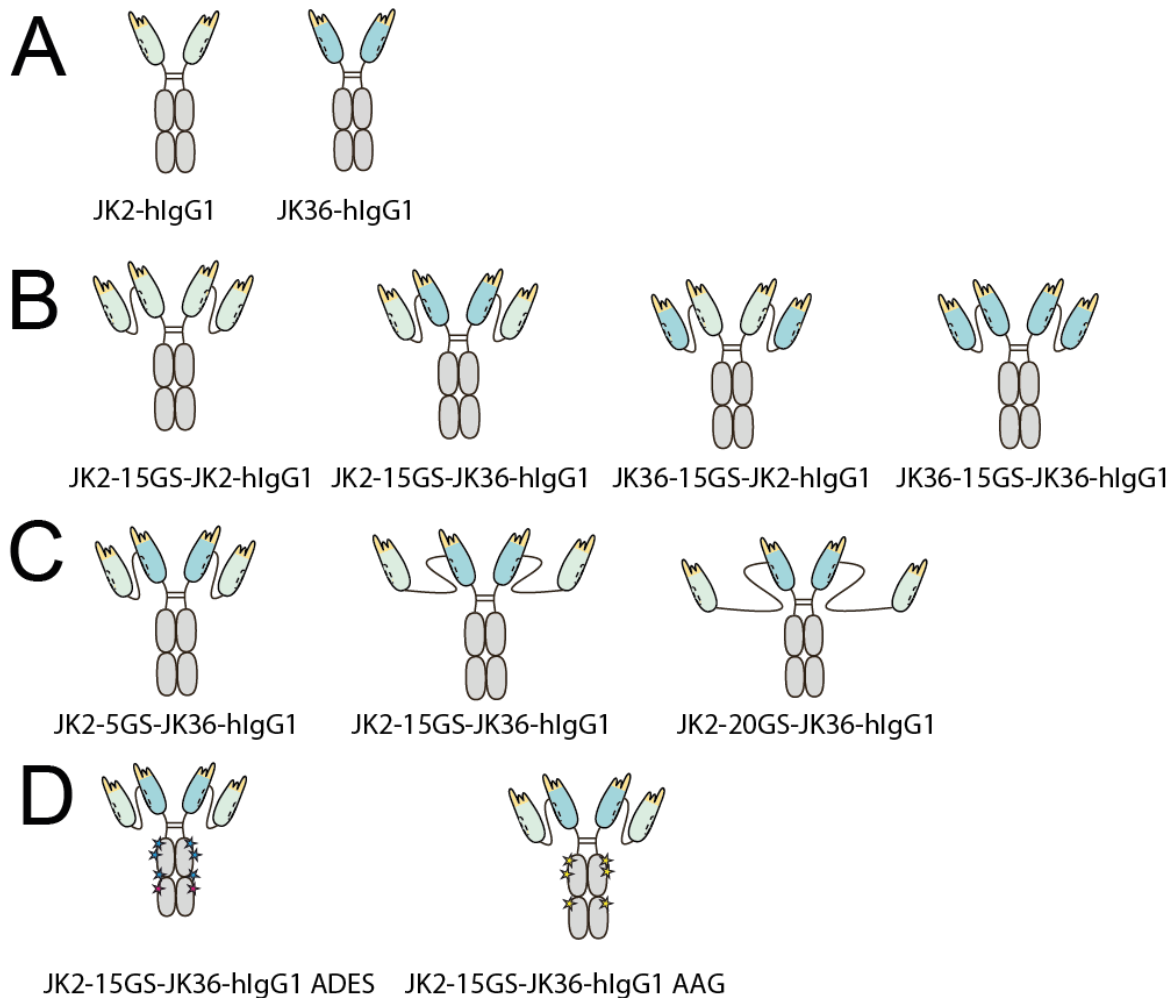


Abbildung 1.6: Schwere-Ketten-Antikörper können durch eine Veränderung der Einzeldomänen-Antikörper, der GS-Linkerlänge und der Fc-Teile modifiziert werden. (A) Bivalente Schwere-Ketten-Antikörper mit zwei Antigenbindungsstellen; **(B)** Tetravalente und tetravalente biparatopische Schwere-Ketten-Antikörper; **(C)** Tetravalente biparatopische Schwere-Ketten-Antikörper mit einer 5GS-, 15GS- und 20GS-Linkerlänge; **(D)** Tetravalente biparatopische Schwere-Ketten-Antikörper mit einer verstärkenden ADES-Mutation und einer inhibierenden AAG-Mutation.

Eine weitere Möglichkeit ergibt sich durch die Modifikation der Fc-Teile. Bei der Fc-Variante AAG (**Abb. 1.7B**) handelt es sich um eine Knock-Down-Mutation, die dazu führen soll, dass die Effektormechanismen nicht mehr ausgelöst werden. Dies kann etwa dadurch erreicht werden, dass die Bindung des Proteins C1q verhindert wird (Schlothauer et al., 2016). Die Sequenz der Aminosäuren wurde dabei durch Mutationen an den Stellen L234A, L236A und P329G (**Anhang 8.4**) verändert. Bei der

P329G Mutation kann der Fc-Rezeptor durch das Ersetzen von Prolin durch Glycin kein sogenanntes Prolin-Sandwich mit dem Prolin im Fc-Teil mehr bilden. Die Mutation verhindert dadurch die Interaktion mit den Fc-Rezeptoren von Immunzellen und die Bindung an das C1q-Protein. Die Prozesse CDC und ADCC sind dann durch diese Mutationen nicht mehr möglich (Liu et al., 2020). Die AAG-Variante kann so auch als reiner Imaging-Antikörper oder zur Kopplung an Substanzen verwendet werden. Die Fc-Variante ADES (**Abb.1.7B**) mit den Mutationen G236A, S239D, I332E und E430S (**Anhang 8.4**) soll zu einer Verstärkung der Effektormechanismen führen. Bei den Mutationen G236A, S239D und I332E ist bereits bekannt, dass sie eine Verstärkung der ADCC bewirken (Wang et al., 2018). Die Mutation E430S soll die CDC verstärken, indem die Hexamerisierung der Fc-Teile der an das Antigen gebundenen Antikörper gefördert wird (Jong et al., 2016).

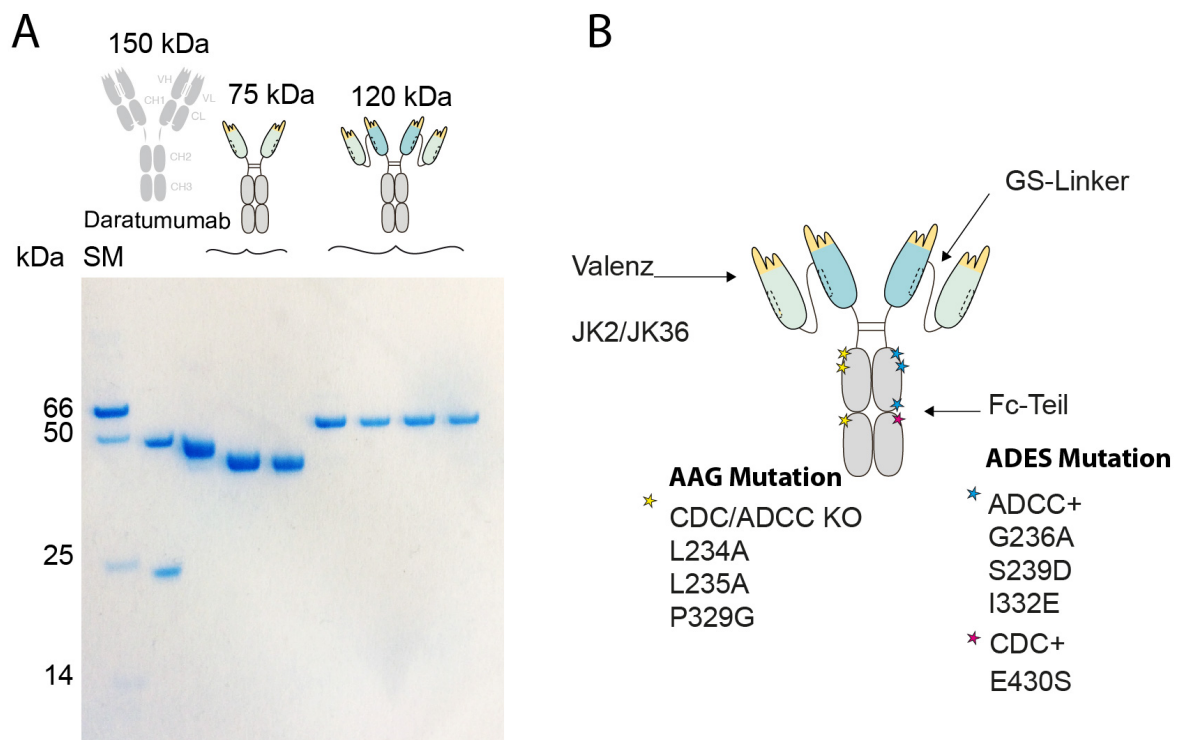


Abbildung 1.7: Schwere-Ketten-Antikörper entstehen durch die Fusion von Einzeldomänen-Antikörpern mit der Hinge-Region und dem Fc-Teil eines konventionellen Antikörpers. (A) SDS-PAGE-Analyse und Coomassie-Färbung von gereinigten Antikörpern; **(B)** Ein Schwere-Ketten-Antikörper verfügt über zwei schwere Ketten. Dadurch gibt es drei Möglichkeiten für eine genetische Veränderung, nämlich bei der Anordnung der Einzeldomänen-Antikörper, beim Linker und beim Fc-Teil. Die mit Adobe Illustrator entworfenen Antikörper wurden anhand der Vorlagen von Julia Hambach erstellt und teilweise verändert.

1.5 Die Zielsetzungen der Arbeit

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Herstellung und Charakterisierung von CD38-spezifischen biparatopischen hcAbs. Dabei soll überprüft werden, ob diese hcAbs eine komplementvermittelte Lyse von CD38-exprimierenden Tumorzelllinien induzieren und/oder die GDP-Cyclase-Aktivität von CD38 inhibieren. Außerdem soll untersucht werden, ob und inwiefern die Funktion der biparatopischen hcAbs durch die Länge des GS-Linkers zwischen den Nanobodies bzw. gezielte Mutationen bei funktionellen Aminosäuren in der Fc-Region beeinflusst werden kann.

2 Material

Die verwendeten Materialien entsprechen etablierten Standards der Arbeitsgruppe AG Nolte/Bannas. In diesem Teil der Arbeit orientieren sich daher Aufbau und Inhalt an Vorarbeiten aus der Arbeitsgruppe Nolte/Bannas des Instituts für Immunologie, UKE Hamburg (vgl. Eden 2018 S.22-28; Fumey 2021, S.17-21; Königsdorf 2016, S.25-32; Schuster 2021, S.34-31, Schütze 2021 S.10-16).

Tabelle 2.1: Antikörper

Zielantigen	Klon	Isotyp	Flourochrom	Firma
hCD38	WF211his	his	APC	AG Nolte
hCD55	IA10	mIgG2a	PE	AG Nolte
hCD59	P282 (H19)	mIgG2a	FITC	AG Nolte
hCD73	SB#96	rbFc	PE	AG Nolte
hCD203	SB#91	rbFc	APC	AG Nolte
hCD38	Daratumumab	hIgG1	-	Janssen
hCD38	JK2	hcAb hIgG1	-	AG Nolte
hCD38	JK36	hcAb hIgG1	-	AG Nolte
CDTa	L-15	hcAb hIgG1	-	AG Nolte
hC1q	-	Nr. 191	FITC	-

Tabelle 2.2: Chemikalien

Chemikalie	Firma
2x-Hefeextrakt-Tryptone (2xYT)	BD Difco
Agar	BD Difco
Agarose	Invitrogen
Antarktische Phosphatase-Puffer	New England BioLabs
BSA	New England BioLabs
Carbenicillin	Gibco
Coomassie-Färbelösung	Invitrogen
Cutsmart-Puffer	New England BioLabs
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen
D-Luciferin	Biosynth AG
DMSO	Merck
DNA-Ladepuffer 6x	Fermentas
dNTPs	Invitrogen

Chemikalie	Firma
F17	Gibco
Fötale Kälberserum (FKS)	Biochrom
Gel Trocknungslösung	Invitrogen
Geneticin G418	Gibco
Glukose	Sigma
Glutamin	Gibco
Hefeextrakt	Gibco
Humanes Serum (gepoolt)	AG Nolte
Jet-PEI	Polyplus
KCl	Roth
KOD-Puffer	Novagen
L-Glutamin	Gibco
LB-Agar	BD Difco
LB-Medium	BD Difco
MES 20x SDS Laufpuffer	Invitrogen
MgCl ₂	Fluka
MgSO ₄	Novagen
NaCl 0,9%ige Lösung	Braun
Natriumpyruvat	Gibco
NuPAGE Probenreduktionsmittel, 10x	Invitrogen
NuPAGE LDS Probenpuffer, 4x	Invitrogen
PBS	Gibco
Pluronic	BASF
Propidiumiodid	Invitrogen
Polyacrylamid-Gel	NuPAGE Novex
Protein G	GE Healthcare
Puromycin	InvivoGen
Q5 Reaktionspuffer	NEB
Roti GelStain-Farbstoff	Roth
RPMI 1640	Gibco
TAE-Puffer	Invitrogen
Trypsin, 10x	Invitrogen
Tryptone	Organotechnie

Tabelle 2.3: DNA-Oligonukleotide (Primer)

Primer	Sequenz (5' - 3')	Firma
36 pcil fwd	TCGGACATGTCCCAGGTGCAACTG	Sigma
BGH rev	TAGAAGGCACAGTCGAGG	Sigma

Tabelle 2.4: Plasmide

Gen	Vektor	Firma
hlgG1	pCSE2.5_hlgG1Fc	AG Nolte
hlgG1 ADES	pCSE2.5_hlgG1Fc	AG Nolte
hlgG1 AAG	pCSE2.5_hlgG1Fc	AG Nolte
JK2-5GS-JK36	pCSE2.5_hlgG1Fc	AG Nolte
JK2-15GS-JK2	pCSE2.5_HIS_myc	AG Nolte
JK2-15GS-JK36	pCSE2.5_HIS_myc	AG Nolte
JK2-20GS-JK26	pCSE2.5_HIS_myc	AG Nolte
JK36-15GS-JK2	pCSE2.5_HIS_myc	AG Nolte
JK36-15GS-JK36	pCSE2.5_HIS_myc	AG Nolte

Tabelle 2.5: DNA-Standards

Standard	Firma
GeneRuler 1 kb DNA-Leiter	Thermo Fischer

Tabelle 2.6: Enzyme

Enzym	Firma
Antarktische Phosphatase	New England BioLabs (NEB)
NotI	NEB
NcoI	NEB
PciI	NEB
Q5 High Fidelity DNA-Polymerase	NEB
T4 DNA-Ligase	NEB
XbaI	NEB

Tabelle 2.7: Eukaryotische Zellen

Zelllinie	Firma	Spezies	Zelltyp	Immunphänotyp
CA-46	DSMZ (Nr. ACC 73)	human	Burkitt Lymphom	CD19+, CD20+, CD38+, CD55+, CD59+
Daudi	DSMZ (Nr. ACC 78)	human	Burkitt Lymphom	CD19+, CD20+, CD38+, CD138-, CD55 +/-, CD59-
HEK293-6E adhärent	AG Nolte	human	Embryonale Nierenzellen	-
KMS-12-BM	DSMZ (Nr. 551)	human	Multiples Myelom	CD19-, CD38+, CD55+, CD59+, CD138+
LP-1	DSMZ (Nr. ACC 41)	human	Multiples Myelom	CD19-, CD20-, CD38+, CD55-, CD59-, CD138+
RPMI-8226	DSMZ (Nr. ACC 402)	human	Multiples Myelom	CD19-, CD20-, CD38+, CD55+, CD59+, CD138+

Tabelle 2.8: Laborgeräte

Gerät	Modell	Firma
Autoklav	Evo130	MediTech
DNA-Gelelektrophorese	40-07-08	Peqlab Biotechnology
Durchflusszytometer	FACSCanto2 FACSCelesta	BD Biosciences
Elektroporationsgerät	GFL1004	GFL
Fluoreszenz-Mikroplatten-Reader	Tecan Infinite M200	Tecan
Heizblock	Thermomixer 5436	Eppendorf
Inkubationsschüttler	HT INFORS	Unitron
Inkubator	MCO-20AIC	Sanyo
Kreisschüttler	Vortex	neoLab
Lichtmikroskop	Axiovert 25	Zeiss
Mikrotiterplattenleser	Victor2 D	Perkin-Elmer
Mikrowelle	M 638	EC Miele
PCR-Maschine	T3 Thermocycler	Biometra
Pipetten	Research-Line	Eppendorf
Gelelektrophorese	Xcell II MiniCell	Invitrogen
Präzisionswaage	Scout Pro	OHAUS
Spannungsgerät	BI0105 LVD	Biometra
Spektralphotometer	Nanodrop 2000c	Peqlab biotechnology
Sterile Werkbank	HeraSafe	Heraeus
UV-Transilluminator	Biovision B3026	Peqlab Biotechnology

Gerät	Modell	Firma
Waage	Scout Pro	OHAUS
Wasserbad	LAUDA006T	LAUDA
Zählkammer	Neubauer	Marienfeld
Zentrifugen	Centrifuge 5910 Ri	Eppendorf
	Centrifuge 5417 R	Eppendorf
	C1413 Galaxy Mini	VWR

Tabelle 2.9: Lösungen

Luciferin-Arbeitslösung	10 µ Luciferin [30 µg/ µl] auf 2ml PBS
-------------------------	--

Tabelle 2.10: Medien

Medium	Zusammensetzung
2xYT	31 g/l in 1l dH ₂ O
2xYT-Agar	15,5 g 2xYT, 7,5 g Bacto Agar, 500 ml dH ₂ O
LB	25 g/l in dH ₂ O
Einfrüermedium	10 % DMSO, 50 % FCS, 40 % Medium
F17 Komplettmedium	500 ml FreeStyle™ F17 Expressionsmedium, 10 ml L-Glutamin 4 mM, 50 µl Pluronic 10 %, 250 µl Geneticin, 5 ml FCS
F17 Transfektionsmedium	500 ml FreeStyle™ F17 Expressionsmedium, 10 ml L-Glutamin 4mM, 50 µl Pluronic 10 %
Feeding Medium	250 ml Transfektionsmedium, 50 g Tryptone
RPMI Komplettmedium	500 ml RPMI 1640 Medium, 5 % FCS, 1 % Glutamin, 1 % Natrium-Pyruvat
SOC-Medium	0,5 % Hefeextrakt, 2 % Tryptone, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 20 mM Glukose

Tabelle 2.11: Prokaryotische Zellen

Bakterien	Firma
dam-/dcm- C2925H E. coli	NEB
XL-1 Blue E. coli	Aligent

Tabelle 2.12: Proteinstandards

Standard	Zusammensetzung	Firma
Supermarker 1x SM	100 µg/ml BSA, 50 µg/ml IgG schwere Kette, 25 µg/ml IgG leichte Kette, 10 µg/ml Lysozym	AG Nolte

Tabelle 2.13: Reagenzsysteme

Anwendung	Name	Firma
Gelextraktion	Nucleospin Gel PCR Clean-Up	Macherey-Nagel
Plasmidpräparation	QIAprep Spin Miniprep Kit Endofree Plasmid Maxi Kit	Qiagen
BCA-Assay	Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific

Tabelle 2.14: Software

Programm	Firma
4 Peaks	Version 1.7.2
Adobe Illustrator CS5	Adobe
FlowJo 10.08.0	BD
Microsoft Excel	Microsoft
Microsoft Word	Microsoft
Prism5	GraphPad
Zotero 5.0.97	Zotero

3 Methoden

Die verwendeten Methoden entsprechen etablierten Standards der Arbeitsgruppe AG Nolte/Bannas und waren bereits durch Mitglieder der Arbeitsgruppe erarbeitet (vgl. Eden 2018 S.29-53; Fumey 2021, S.22-38; Königsdorf 2016, S.33-44; Schuster 2021, S.32-46, Schütze 2021 S.16-29).

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion

DNA kann durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit geeigneten Oligonukleotid-Primern, Puffern, Nukleotiden und Polymerase vervielfältigt werden. Bei der Amplifikation der Nanobodies wurden die Q5-Polymerase mit dem dazugehörigen Puffer, Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs) und Primer verwendet. Nanobody-Monomere und Nanobody-Dimere wurden mit pCSE2.5 His/Myc Plasmidvektoren auf pCSE2.5 hFc IgG1 umklontiert. Der pCSE2.5 Plasmidvektor wurde verwendet, weil er besonders gut für die Produktion in HEK293-6E Zellen geeignet ist.

Durch die PCR können die Inserts amplifiziert werden, die dann mit Restriktionsenzymen verdaut und mit einem Vektor ligiert werden. Für die Herstellung der tetra-valenten Schwere-Ketten-Antikörper wurden die Nanobody-Dimere durch PCR vervielfältigt. Dafür wurde in die Konstrukte mit dem Nanobody JK2 im Plasmid eine PciI-Schnittstelle eingefügt, da die JK2-Konstrukte über eine interne NcoI-Schnittstelle verfügen und so bei Verdau mit dem Restriktionsenzym NcoI an der falschen Stelle gespalten würden. Dabei wurden für die Klonierung der tetra-valenten hcAbs bereits in Plasmiden vorliegende Nanobody-Dimere verwendet (Schuster, 2021).

Die PCR bezieht sich auf die Phasen der Denaturierung, des Annealings und der Elongation. Bei der Denaturierung trennen sich die beiden Stränge der Ausgangs-DNA. Sie wird bei 98 °C durchgeführt. Nach der Denaturierung kommt die Annealing-Phase. Die Temperatur wird dabei auf 58 °C gesenkt, sodass sich die Oligonukleotid-Primer an die Einzelstränge der Template-DNA anlagern und mit ihr hybridisieren können. Es wurden der 36 pciI fwd Primer und der BGH reverse Primer verwendet, die sich am 3'-Ende der Einzelstrang-DNA anlagern. Nach der Annealing-Phase folgt

die Elongationsphase. Bei einer Temperatur von 72 °C als dem Temperaturoptimum der DNA-Polymerase wird der Oligonukleotid-Primer verlängert. Die DNA-Polymerase beginnt ausgehend von den Oligonukleotid-Primern damit, die einzelnen dNTPs anzusetzen, wodurch ein komplementärer Strang synthetisiert wird. Am Ende der Elongation liegt wieder eine doppelsträngige DNA vor, die der ursprünglichen Template-DNA entspricht. Nach einem Zyklus wird die Anzahl der Templates verdoppelt und nach zwei Zyklen wird sie vervierfacht. Dieser Zyklus wird dann für eine bestimmte Anzahl wiederholt. Danach wird nochmals eine finale Elongation durchgeführt, bei der die DNA-Polymerase mehrere Minuten bei 72 °C wirken kann. Anschließend wird der Ansatz auf 4 °C heruntergekühlt. Die Template-DNA wurde nach diesem Protokoll im Thermocycler amplifiziert.

3.1.2 Restriktionsverdau und Dephosphorylierung des Vektorplasmids

Beim Restriktionsverdau werden die PCR-Produkte und Vektorplasmid von Restriktionsenzymen verdaut, den sogenannten Restriktionsendonukleasen. Die Restriktionsenzyme erkennen dabei bestimmte DNA-Sequenzen und können sie dann spezifisch ausschneiden. Die zu verdauende DNA wurde zusammen mit den Restriktionsenzymen und Puffer in einen Ansatz pipettiert. Im Puffer 3.1 haben die Enzyme NcoI, PciI und NotI eine ausreichend hohe Aktivität. Der Restriktionsverdau wurde in einem 30 µl Ansatz mit dH₂O, Enzymen, Puffer und DNA angesetzt und im Thermocycler bei 37 °C für 2 Stunden durchgeführt. Danach wurde der Verdau bei 65 °C inaktiviert, um ihn dann bei 4 °C ruhen zu lassen. Nach dem Verdau des Vektorplasmids konnten sich die beiden geschnittenen Enden wieder zusammenlagern. Durch die Dephosphorylierung der Vektor-DNA, also eine Entfernung der an den 5'-DNA-Enden verbleibenden Phosphatreste, kann die Selbstligation reduziert werden. Dafür wurde der Vektorplasmid-Ansatz nach dem Verdau mit 1 µl Antarktischer Phosphatase und 3 µl des dazugehörigen Puffers für eine Stunde bei 37 °C inkubiert (Schuster 2021, S.33). Danach wurde die Reaktion 20 min bei 65 °C deaktiviert und dann bei 4 °C pausiert. Wie die PCR-Produkte wurden auch die verdauten DNA-Fragmente über ein Agarosegel aufgetrennt und dadurch aus dem Gel isoliert. Die DNA-Konzentrationen wurden dann mit einem Spektralphotometer gemessen, um das geeignete Volumen für den Ligationsansatz berechnen zu können.

Tabelle 3.1: Ansatz für den Restriktionsverdau

DNA/Vektorplasmid	2 µg
Enzym 1	1 µl NcoI/PciI
Enzym 2	1 µl NotI
dH ₂ O	(30 µl – DNA/Vektorplasmid µl)
Puffer 3.1	3 µl
Gesamt	30 µl

3.1.3 Die Ligation von Vektor und Insert

Die durch den Restriktionsverdau entstandenen DNA-Fragmente mit kompatiblen Schnittstellen von Vektorplasmid und Insert wurden in einer Ligationsreaktion zusammengesetzt. Die T4 DNA-Ligase wurde dabei zusammen mit Vektor, Insert, destilliertem H₂O (dH₂O) und dem geeigneten Ligasepuffer in einem 20 µl Ansatz für 14 h bei 14 °C im Thermocycler inkubiert. Vektor und Insert wurden dann in einem molaren Verhältnis von 1:3 in den Ligationsansatz gegeben, wobei für den Ansatz 150 ng des verdauten pCSE2.5_hlgG1Fc_s eingesetzt wurden. Dann wurde die benötigte Menge des Inserts mit dem „Ligation Calculator“ der Universität Düsseldorf berechnet.

3.1.4 Die Transformation in kompetente E. coli

Das Einbringen von freier DNA durch ein Vektorplasmid in kompetente Bakterien wird als Transformation bezeichnet. Die Transformation gehört zu den Basistechniken in der Molekularbiologie (Froger and Hall, 2007). Die durch die Klonierung entstandenen neuen Vektorplasmide, die für die Nanobodies, die Hinge-Region und die CH2- und CH3-Domäne der Schwere-Ketten-Antikörper kodieren, wurden in die Zellen von kompetenten Escherichia coli (E. coli) transformiert. Durch eine selektive Vermehrung der Bakterienzellen, die nach der Transformation das neue Plasmid mit der darin enthaltenen Carbenicillin-Resistenz enthielten, konnten die neuen Plasmide vermehrt werden.

Für die Transformation wurden XL-1 Blue E. coli oder dam-/dcm-C2925H E. coli verwendet (Schuster 2021, S.35). Für die Retransformation der Nanobody-Dimere JK2-15GS-JK2, JK2-15GS-JK36 und JK36-15GS-JK2 wurden die dam-/dcm-C2925H E. coli verwendet, um Plasmide herzustellen, deren XbaI-Schnittstelle nicht methyliert

(**Abb. 8.1**) ist. Dadurch konnten die Plasmide nach der Retransformation mit den Restriktionsenzymen XbaI und NotI ausgeschnitten werden.

Vor der Transformation wurden LB-Carbenicillin-Platten vorbereitet. Die kompetenten *E. coli* wurden aus einem -80 °C Gefrierschrank entnommen. Pro Ansatz wurden je 50 µl verwendet. Das SOC-Medium wurde in einem Heizblock auf 42 °C vorgewärmt. Die LB-Carbenicillin-Platten wurden in einem Bakterieninkubator bei 37 °C vorgewärmt. Die *E. coli* wurden dann mit 50 µl pro Ansatz in 1,5 ml Mikroreaktionsgefäße pipettiert. Pro Ansatz wurden je 2 µl Ligationsansatz hinzugegeben. Die Ansätze wurden anschließend 20 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die *E. coli*-Ligationsansätze für 30 s bei 42 °C hitzegeschockt. Durch den Hitzeschock werden die Poren in der Zellmembran der Bakterienzellen geöffnet, wodurch die DNA in das Innere der Zelle gelangen kann. Nach dem Hitzeschock wurden die Ansätze für 2 min auf Eis inkubiert (Königsdorf 2016, S.35). Zu den Ansätzen wurden dann 450 µl SOC-Medium pipettiert. Der Ansatz mit dem SOC-Medium und den transformierten *E. coli* wurde bei 37 °C und 800 rpm für eine Stunde im Thermoschüttler inkubiert. Danach wurden jeweils 150 µl *E. coli*-Transformationsansatz pro LB-Carbenicillin-Platte ausgestrichen. Die das Antibiotikum enthaltenden Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C im Bakterieninkubator inkubiert (Schuster 2021 S.35). Gut abgrenzbare Kolonien wurden am nächsten Tag mit einer sterilen Ösenspitze gepickt. Die gepickten Kolonien wurden dann in einem 15 ml Falcon mit 5 ml LB-Carbenicillin-Medium (Carbenicillin 100 µg/ml) für das Proliferieren über Nacht bei 37 °C und 320 rpm im Thermoschüttler inkubiert (Schuster 2021, S.35).

3.1.5 Die Plasmidpräparation aus kompetenten *E. coli*

Die Plasmidpräparation dient der Isolierung von Plasmid-DNA. Durch die Plasmidpräparation kann die DNA extrahiert werden. Die Plasmidpräparation wurde nach der Transformation und Vermehrung der neu klonierten Plasmid-DNA in kompetenten *E. coli* durchgeführt. Dabei gibt es die Möglichkeiten einer sogenannten Mini-Prep oder einer Maxi-Prep. Für die Mini-Prep wurden 5 ml und für die Maxi-Prep 100 ml Carbenicillin enthaltendes inokuliertes LB-Medium verwendet. Die Plasmidpräparation wurde mit den Reagenzsystemen QIAprep Spin Miniprep Kit (Mini-Prep) und dem Endo-free Plasmid Maxi Kit (Maxi-Prep) von Qiagen durchgeführt. Nach der Extraktion und

Präparation der Plasmid-DNA wurden die Konzentration und Reinheit der doppelsträngigen Plasmid-DNA durch Spektralphotometrie gemessen.

3.1.6 Die DNA-Sequenzierung

Nach der Klonierung und Plasmidpräparation aus den Zellen der kompetenten E. coli musste die Plasmid-DNA sequenziert werden, um die Klonierung zu überprüfen. Die Sequenzierungen wurden von Eurofinsgenomics durchgeführt. Dabei wurde das Mix2 Seq Set von Eurofins verwendet, um die Plasmide für die Sequenzierung vorzubereiten. Die Konzentration der Plasmid-DNA für die Sequenzierung sollte bei 50-100 ng/µl liegen. Die Plasmid-DNA wurde entsprechend verdünnt oder konzentriert. Pro Sequenzierungsansatz wurden insgesamt 1 µl der Mischung von Plasmid-DNA und dH₂O verwendet. Zu diesem Ansatz wurden dann 2 µl Primer (fwd/rev) in das Sequenzierungstube pipettiert. Die DNA-Sequenz wurde mit dem Programm 4 Peaks ausgewertet.

3.1.7 Agarosegel-Elektrophorese

Mit der Agarosegel-Elektrophorese können DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufgetrennt werden, wodurch die Größe von DNA-Fragmenten leicht und schnell sichtbar gemacht werden kann. In einem 1%igen Agarosegel wurden die DNA-Fragmente durch Elektrophorese aufgetrennt und mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Das Agarosegel bestand aus 1 % Agarose gelöst in TAE-Puffer mit 1:200 Ethidiumbromid. Bei der Gelelektrophorese wurden eine Laufzeit von ca. 35 min bei einer Spannung von 100-120 V verwendet. Die negativ geladene DNA wandert dabei durch das elektrische Feld zur Anode als dem Pluspol. Je kleiner die DNA-Moleküle und je höher die Spannung im elektrischen Feld ist, umso schneller wandern die DNA-Fragmente im Gel. Die DNA-Fragmente im TAE-gepufferten Agarosegel wurden dann durch einen UV-Transilluminator sichtbar gemacht. Die Aufnahme des Gels unter UV-Licht wurde dokumentiert und die Gel-DNA-Fragmente ausgeschnitten. Die UV-Exposition musste dabei möglichst kurz gehalten werden, weil es sonst durch das UV-Licht zu Schäden in der DNA kommt. Die Aufreinigung der Gel-DNA-Fragmente wurde mit dem Nucleospin Gel and PCR Clean-Up Set von Macherey-Nagel durchgeführt. Die Elution der DNA nach der Aufreinigung des Gels erfolgte

mit dH₂O. Danach wurden die DNA-Konzentrationen mit einem Spektralphotometer gemessen.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Zellkultur

Die Kultivierung der verwendeten Zelllinien wurde bereits vorher in der Arbeitsgruppe Nolte/Bannas etabliert. Die humanen Myelom-Zelllinien KMS-12-BM (DSMZ Nr. ACC 551), LP-1 (DSMZ Nr. ACC 41) und RPMI-8226 (DSMZ Nr. ACC 402) und die humanen Burkitt-Lymphom-Zelllinien Daudi (DSMZ Nr. ACC 78) und CA-46 (DSMZ Nr. ACC 73) wurden als eine Suspensionskultur in RPMI vollständig im Zellmedium kultiviert. Dabei wurden auch CA-46 luc, Daudi luc und LP-1 luc Zellen, die stabil die luc2 Variante von Photinus pyralis luciferase (Promega, Madison, WI, USA) exprimieren, verwendet (Hambach et al., 2020). Die Luciferase exprimierenden Zellen wurden schon vorher durch eine lentivirale Transduktion hergestellt (Hambach et al., 2020). Die mit Luciferase transduzierten LP-1 luc Zellen wurden für die Selektion mit 10 µl Puromycin pro 10 ml Medium versetzt. Die Separation der Zellen wurde dreimal wöchentlich durchgeführt. Die Verdünnung der Zellen erfolgte um den Faktor 1:5 mit frischem RPMI Komplettmedium.

Für die Produktion der Antikörper wurden HEK293-6E Zellen verwendet. Bei diesen „Human embryonic kidney“ Zellen handelt es sich um humane embryonale Nierenzellen. Für die Produktion von Fc-Konstrukten wurden die adhärenenten HEK293-6E Zellen in einem Medium kultiviert, das zu 70 % aus F17-Komplettmedium und zu 30 % aus F17-Medium „gebraucht“ bestand. Das F17-Medium „gebraucht“ wurde bei der Transfektion von Zellen gesammelt, bei 4000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert und danach steril filtriert. Die adhärenenten HEK293-6E Zellen wurden mit Trypsin gelöst, dann gewaschen und danach mit einer 1:5 Verdünnung kultiviert. Alle kultivierten Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert (Schuster 2021, S.43). Die Separation der Zellen wurde dreimal wöchentlich in Abständen von 2-3 Tagen durchgeführt. Vor der Zellseparation wurden die kultivierten Zellen mikroskopisch auf Verunreinigungen durch Bakterien oder Pilze überprüft. Die Zellseparation erfolgte in einer sterilen Werkbank.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Die Produktion von Antikörpern durch Transfektion von HEK293-6E Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurde durch Transfektion Plasmid-DNA in eukaryotische HEK293-6E Zellen eingebracht. Diese Zellen produzieren nach der Transfektion die auf dem Plasmid-Vektor kodierten Proteine. Die HEK293-6E Zellen wurden mit den pCSE2.5_hlgG1Fc Plasmidvektoren transient transfiziert. Hinter dem Nanobody werden dabei auf dem Plasmidvektor die Hinge-Region und die CH2- und CH3-Domäne des Schwere-Ketten-Antikörpers kodiert. Die Hinge-Region und die CH2- und CH3-Domäne bilden den humanen Fc-Teil des Konstrukts. In der vorliegenden Arbeit wurden tetravalente hcAbs mit einem humanen IgG1 Fc-Teil kloniert und produziert.

Die kultivierten HEK293-6E Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion in einem Verhältnis von 1:5 bis 1:10 separiert. Am Tag der Transfektion wurde das F17-Medium der Zellen eine Stunde vor der Transfektion durch ein F17-Transfektions-Medium ausgetauscht. Für die Transfektion der Zellen wurde ein 750 µl DNA-Mix mit 20 µg DNA und dH₂O angesetzt, dem dann 750 µl 300 mM NaCl-Lösung zugesetzt wurden. Auf diesen DNA-Ansatz wurden danach vorsichtig 1,5 ml Polyethylenimin-Mix (PEI-Mix) getropft. Dieser Ansatz wurde wiederum 10 s gevortext und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die 3 ml DNA/PEI-Mix wurden vorsichtig und gleichmäßig auf die Zellen getropft. Am Tag nach der Transfektion wurden die transfizierten HEK293-6E Zellen mit 500 µl frischem Medium versorgt. Die Zellen geben nach der Transfektion die exprimierten Proteine in den Überstand ab. Nach 7 Tagen wurde der Überstand der Zellen abgenommen und bei 4000 rpm für 10 min bei 4 °C zentrifugiert (Schuster, 2021 S.35). Der Überstand wurde steril filtriert und 10 µl wurden auf ein SDS-PAGE aufgetragen und mit Coomassie gefärbt, um vor der aufwendigen Aufreinigung der Proteine den Erfolg der Transfektion und der Produktion der Konstrukte überprüfen zu können. Auf die SDS-PAGE wurden ebenfalls Marker mit bekannter Proteingröße und Konzentration aufgetragen, um anhand der Marker auf die Größe der produzierten Proteine schließen zu können. Der Supermarker (SM) enthält einmal in einfacher (1x) und einmal in vierfacher (4x) Menge Bovines Serumal-

bumin (BSA) (1µg, 66 kDa), IgG schwere Kette (500 ng, 50 kDa), IgG leichte Kette (250 ng, 25 kDa) und Lysozym (100 ng, 16 kDa).

3.3.2 Die Aufreinigung der Antikörper

Nach der Transfektion der HEK293-6E Zellen mit den Plasmidvektoren und Produktion der hcAbs wurden die Proteine aufgereinigt. Der Überstand wurde für 10 min bei 4000 rpm und 4 °C zentrifugiert und anschließend steril filtriert (Schütze 2021, S.21). Die Aufreinigung der Proteine erfolgte über Protein A Säulen (GE Healthcare). Durch die hochaffine Bindung des humanen Fc-Teils der Schwere-Ketten-Antikörper an das Protein A konnten die Überstände durch die mit Protein A beschichteten Säulen aufgereinigt werden. Die Elution erfolgte mit dem IgG Elution Buffer pH 2,8 (Thermo Scientific). Die IgG-Affinitätsreinigung wurde im nächsten Schritt über die Dissoziation der Antikörper vom IgG-bindenden Protein A durch den IgG Elution Buffer durchgeführt. Der Durchfluss wurde mit einem Neutralisationspuffer (pH 9) neutralisiert, damit die Antikörper nicht zu lange in der Lösung mit einem niedrigen pH-Wert bleiben. Der Pufferaustausch erfolgte durch eine PD-10-Säule und PBS +/+. Der Durchfluss wurde dabei durch einen Amicon-Ultrazentrifugen-Filtereinsatz eingeeengt. Durch Amicon können vorgereinigte Proteine aus Säulen-Eluenten konzentriert werden. Der Amicon-Ultrazentrifugen-Filtereinsatz besteht aus einer Cellulose-Membran mit einem MWCO-Wert von 10 kDa. Die Konzentration der Antikörper wurde durch eine Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay) bestimmt. Jeweils 1 µg des aufgereinigten Proteins wurden dabei auf die SDS-PAGE aufgetragen. Die Disulfidbrücken der Antikörper wurden dann mit Dithiotreithol (DTT) gespalten. Die SDS-PAGE ermöglicht eine Analyse der Molekülgröße der Antikörper. Der Supermarker (SM) enthält einmal in einfacher (1x) und einmal in vierfacher (4x) Menge BSA (1 µg, 66 kDa), IgG schwere Kette (500 ng, 50 kDa), IgG leichte Kette (250 ng, 25 kDa) und Lysozym (100 ng, 16 kDa).

3.3.3 Die Gelelektrophorese

Die Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine Form der Gelelektrophorese, bei der Proteine in einem elektrischen Feld anhand ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden können. Nach der Klonierung, Produktion und Aufreinigung der modifizierten hcAbs kann bei der SDS-PAGE das Molekular-

gewicht der Proteine bestimmt werden. Dadurch bietet die SDS-PAGE eine relativ einfache Möglichkeit für eine Überprüfung des Erfolgs der Produktion und Aufreinigung.

Für die SDS-PAGE wurden 10 µl des aufgereinigten Antikörpers zusammen mit 10 µl Ladepuffer für 15 min bei 70 °C inkubiert und anschließend bei 1100 rpm für 1 min zentrifugiert (Königsdorf 2016, S.44). Der Ladepuffer dient einer Erhöhung der Menge der Probe bei der Gelelektrophorese und einer Denaturierung der Proteine. Der Ladepuffer bestand aus einer Mischung von 3 µl dH₂O, 5 µl Nu PAGE LDS Sample Buffer (4x) und 2 µl DTT. DTT spaltet als Reduktionsmittel die Disulfidbrücken. Die Gelelektrophorese-Kammer wurde mit MES-Laufpuffer befüllt, wobei ein NuPAGE Bis-Tris Proteingel mit einer Konzentration von 12 % Polyacrylamid eingesetzt wurde. Die Proteine wurden bei 200 V, einer Stromstärke von 110 mA und einer Laufzeit von 35 min aufgetrennt. Die aufgetrennten Proteine wandern anhand ihres Molekulargewichts unterschiedlich schnell durch das Polyacrylamidgel. Durch den Coomassie-Proteinfarbstoff wurden die Proteine über Nacht angefärbt. Die Proteinbanden wurden dann durch die anschließende Entfärbung des Gels für 6-8 h mit dH₂O und Aktivkohlebeuteln sichtbar. Das Gel wurde danach getrocknet und per Scan dokumentiert.

3.3.4 Ein Fluoreszenzassay zur Messung der isolierten Cyclase-Aktivität

Extrazelluläres NAD⁺ wird im Tumormikromilieu zu Adenosin metabolisiert. Dabei setzt CD38 NAD⁺ zu ADPR und cADPR um, wobei die Umsetzung vermutlich über ein Intermediat verläuft. Humanes CD38 verfügt sowohl über eine Cyclase- als auch eine Hydrolase-Aktivität in einem Verhältnis von 1:99. Die isolierte Cyclase-Aktivität von CD38 kann dabei in einem Fluoreszenzassay gemessen werden. Weil das Substrat NGD⁺ von CD38 nur zu cGDPR umgesetzt werden kann, kann eine isolierte Messung der Cyclase-Aktivität von CD38 ermöglicht werden.

Die Messung mit dem Fluoreszenzassay wurde unter der Anleitung von Dr. Ralf Fliegert und mit der Unterstützung der biologisch-technischen Assistentin Frederike Kulow (AG Guse) durchgeführt. Die Zellen, Reagenzien und Geräte wurden dabei freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Der Fluoreszenzassay war in der Arbeitsgruppe Guse bereits ein etabliertes Experiment. Die neu hergestellten tetravalenten und CD38-spezifischen hcAbs konnten so mit dem Fluoreszenzassay auf inhibitor-

sche und exzitatorische Effekte auf die Cyclaseaktivität von CD38 untersucht werden. Die Messung mit dem Assay wurde im Tecan Mikroplatten Reader mit CD38-positiven HEK293 Zellen durchgeführt, um die Inhibition bzw. Stimulation der Cyclase-Aktivität durch hcAbs zu überprüfen. Ein solcher Fluoreszenzassay zur Testung der Inhibition bzw. Stimulation der Cyclase-Aktivität von CD38 durch Nanobodies wurde bereits in Vorarbeiten verwendet (Fumey et al., 2017).

Bei der Durchführung wurden $3 \cdot 10^4$ CD38-positive HEK293 Zellen in 80 μ l Calcium-Messpuffer pro Well pipettiert. Für die Berechnung des Ausgangswerts wurden auch Ansätze mit CD38-negativen HEK293 Zellen verwendet. Bei jedem Ansatz wurden 10 μ l mit je 100 ng hcAb hinzugefügt. Als Substrat wurden pro Well 50 μ M NGD⁺ eingesetzt. Der Versuch wurde bei einer Temperatur von 37 °C durchgeführt. Die Synthese von cGDPR wurde durch Fluoreszenzspektroskopie mit dem Mikroplatten Reader Tecan Infinite M200 gemessen. Als Negativkontrolle diente der hcAb L-15-hlgG1, der nicht an CD38 bindet. Die Enzymaktivität wurde in relativen Fluoreszenz Units (RFU) pro Sekunde angegeben.

3.4 Immunologische Methoden

3.4.1 Expressionsanalyse

Für die Expressionsanalyse wurden die Zelllinien LP-1 (MM), CA-46 (BL), Daudi (BL), RPMI-8226 (MM) und KMS-12-BM (MM) auf die Expression der Oberflächenproteine CD38, CD55 und CD59 überprüft, indem sie mit Fluorochrom gekoppelten Antikörpern angefärbt wurden.

Die Zell-Konzentration wurde auf $1 \cdot 10^6$ Zellen pro ml eingestellt. Danach wurden jeweils 100 μ l in jedes Well pipettiert. Zu den Zellen wurde dann 1 μ l Antikörper pipettiert und für die Anfärbung der Zellen wurden sie lichtgeschützt für eine Stunde bei 4 °C inkubiert. Nach der Anfärbung der Zellen durch den Färbeantikörper, der spezifisch ein Oberflächenprotein für die Expressionsanalyse anfärbt, wurden die Zellen erneut bei 1600 rpm für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Die angefärbten Zellen wurden dann zweimal durch eine Resuspension mit 200 μ l PBS/BSA gewaschen und erneut zentrifugiert, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Die Analyse der angefärbten Oberflächenproteine wurde dann durch Durchflusszytometrie durchgeführt (FACS Canto 2 und FACS Celesta).

3.4.2 Der CDC-Assay

Der CDC-Assay wurde als immunologische Methode verwendet, um *in vitro* zu quantifizieren, wie effektiv hcAbs die komplementabhängige Zytotoxizität auslösen. Für den Assay wurde pro Well eine sättigende Antikörper-Endkonzentration von 100 nM in 200 µl benötigt. Die Antikörper wurden bei 4 °C vorbereitet. Die Tumorzellen wurden bei 1600 rpm für 5 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen, um Proteinreste zu entfernen. Danach wurden die Zellen in PBS + BSA (0,2 %) aufgenommen und mit der Neubauer-Zählkammer auf eine Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen pro ml eingestellt. Die Antikörper wurden in jeweils 75 µl PBA + BSA (0,2 %) pro Well in einer 96-Well Platte mit einem 3-fachen Ansatz vorbereitet. Pro Well wurden je 100 µl Tumorzellen hinzugegeben und der Ansatz wurde dann 10 min bei 4 °C inkubiert. Zu jedem Ansatz wurden 25 µl humanes, gepooltes und aktives Serum hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte für 90 min bei 37 °C. Nach der Inkubation wurde die Mischung zweimal gewaschen. Die Zentrifugation erfolgte bei 1600 rpm für 5 min bei 4 °C und die Zell-Antikörper-Mischung wurde pro Well mit jeweils 150 µl PBA + BSA (0,2 %) resuspendiert. Danach wurden die Tumorzellen nochmals zentrifugiert und in 150 µl 1:200 PI PBS + BSA (0,2 %) pro Well resuspendiert. Die Ansätze wurden 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Propidiumiodid (PI) ist ein Nukleinsäure-Interkalator, der mit der DNA von Zellen interkaliert, wenn sie nicht mehr über eine intakte Zellmembran verfügen. Die PI-Aufnahme der Zellen korreliert dabei mit der Lyse der Zellen im CDC-Assay. Die PI-Aufnahme der Tumorzellen wurde durch Durchflusszytometrie gemessen.

3.4.3 Der CDC-Assay mit Luciferase transduzierten LP-1 Zellen

Der CDC-Assay wurde in einigen Versuchen auch mit Luciferase transduzierten LP-1 Zellen durchgeführt. Die LP-1 luc Zellen wurden von Kerstin Schütze in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Fehse (UKE Hamburg) durch lentivirale Transduktion hergestellt. Die mit Luciferase transduzierten Zellen wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Der auf Biolumineszenz basierende CDC-Assay wurde ebenfalls bereits in Vorarbeiten von Kerstin Schütze etabliert. Die mit Luciferase transduzierten Zellen setzen Luciferin in Oxyluciferin um, wobei es zu einer Biolumineszenz kommt. Da nur vitale Zellen bei der Anwesenheit von ATP und Luciferin diese Biolumines-

zenz erzeugen können, korreliert die gemessene Biolumineszenz mit der Vitalität der Zellen.

Nach der Inkubation von 50 μl ($1 \cdot 10^6$ Zellen pro ml) LP-1 luc Tumorzellen mit 125 μl PBS-Antikörper-Mischung (1,6 μg hcAb/125 μl) und 25 μl gepooltem humanen Serum für 1,5 h bei 37 °C wurden die Zellen für 5 min bei 1600 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Die Zellen wurden anschließend in 100 μl PBS resuspendiert und mit 100 μl Luciferin-Arbeitslösung für 20 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Biolumineszenz wurde dann mit einem Fluorometer (Viktor2 D Perkin-Elmer) gemessen.

3.4.4 Der C1q-Bindungsassay

Das Komplementprotein C1q ist der erste Faktor des Komplementsystems, der an den Fc-Teil eines Antikörpers bindet, wenn die CDC ausgelöst wird. Für den Assay wurden $1 \cdot 10^6$ Zellen pro ml in PBS+BSA (0,2 %) zusammen mit einer Antikörpermenge von 100 nM verwendet. Zu jeweils 75 μl PBS/BSA Antikörper-Mix wurden 100 μl CD38-exprimierende Tumorzellen gegeben. Die Antikörper wurden dann mit den Tumorzellen für 10 min bei 4 °C inkubiert, damit die Antikörper binden können. Danach wurden 25 μl humanes, gepooltes und hitzeinaktiviertes Serum hinzugefügt. Diese Mischung wurde anschließend für 60 min bei 4 °C inkubiert, damit das C1q sich an die Fc-Teile binden konnte. Die Mischung wurde dann mit 1600 rpm für 5 min bei 4 °C zentrifugiert und jeweils mit 150 μl PBS + BSA (0,2%ig) resuspendiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt, um ungebundenes C1q auszuwaschen. Die Anfärbung des gebundenen C1qs erfolgte mit einem anti-C1q-FITC Antikörper. Die Anfärbung wurde für 30 min bei 4 °C durchgeführt. Anschließend wurde erneut zweimal gewaschen, bei 1600 rpm für 5 min bei 4 °C zentrifugiert und mit 150 μl PBS + BSA (0,2 %) resuspendiert, um nicht gebundene anti-C1q-Antikörper zu entfernen. Die C1q-Bindung wurde dann durch Durchflusszytometrie gemessen.

4 Ergebnisse

4.1 Die Expressionsanalyse von Tumorzellen

CD38 als Zielantigen für die hcAbs sollte hinsichtlich seiner Expressionsstärke auf den Tumorzellen untersucht werden, um die CD38-Expression mit der Effektivität der hcAbs bei der CDC vergleichen zu können.

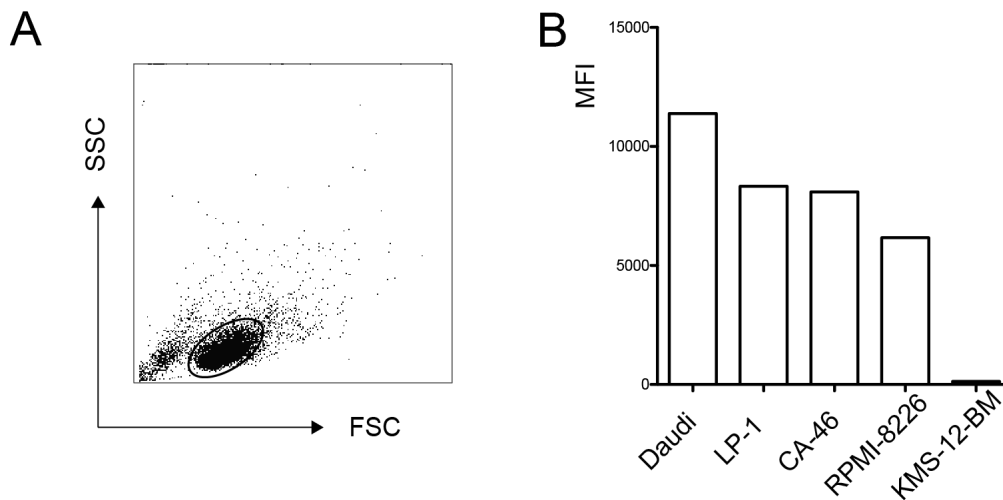


Abbildung 4.1: Myelom-Zellen und Burkitt-Lymphom-Zellen weisen eine unterschiedlich starke Expression von CD38 auf. Nach der Inkubation von Zellen der Tumorzelllinien Daudi, LP-1, CA-46, RPMI-8226 und KMS-12-BM mit einem mit APC konjugierten CD38-spezifischen Antikörper wurde die Expression von CD38 durch Durchflusszytometrie gemessen. **(A)** Das Gating ermöglicht einen repräsentativen FACS-Plot der Durchflusszytometrie. Das Gate für die Lympozyten-Population wurde dabei durch Vorwärtsstreulicht (FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC) definiert (FSC = forward scatter, SSC = side scatter). **(B)** Die CD38-Expression der Zellen ($n = 3$) wurde als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) dargestellt. Als Positivkontrolle dienten die Daudi Zellen und als Negativkontrolle dienten die KMS-12-BM Zellen.

Für die Expressionsanalyse wurden die Tumorzellen mit einem CD38-spezifischen und APC-gekoppelten Antikörper angefärbt. Die Expression wurde durch Durchflusszytometrie gemessen (**Abb. 4.1A**). Die Daudi Zellen zeigten die stärkste, die LP-1 und CA-46 Zellen die zweitstärkste, die RPMI-8226 Zellen die niedrigste und die KMS-12-BM Zellen zeigten gar keine Expression von CD38 (**Abb. 4.1B**). Ähnliche Ergebnisse wurde bereits in Vorarbeiten gezeigt (Schütze 2021, S.36). Nach der Analyse der CD38-Expression wurden im nächsten Schritt die hcAbs hinsichtlich ihrer Effektivität bei der CDC getestet.

4.2 Die Aktivierung der komplementvermittelten Zytolyse durch Schwere-Ketten-Antikörper

4.2.1 Monovalente hcAbs zeigen keine Aktivität bei der CDC, aber in einer Kombination erreichen sie eine hohe Effektivität

Im CDC-Assay wurde untersucht, wie effektiv die komplementvermittelte Lyse der Tumorzellen durch hcAbs ausgelöst wird. Der nichtbindende hcAb L-15 diente dabei als Negativkontrolle und Daratumumab (Dara) diente als Positivkontrolle (**Abb. 4.2A**). Die stärkste Lyse wurde durch eine Kombination von JK2-hIgG1 (Epitop 2) und JK36-hIgG1 (Epitop E3) und durch eine Kombination von Daratumumab (Epitop 2) und JK36-hIgG1 (Epitop 3) ausgelöst (**Abb. 4.2B**).

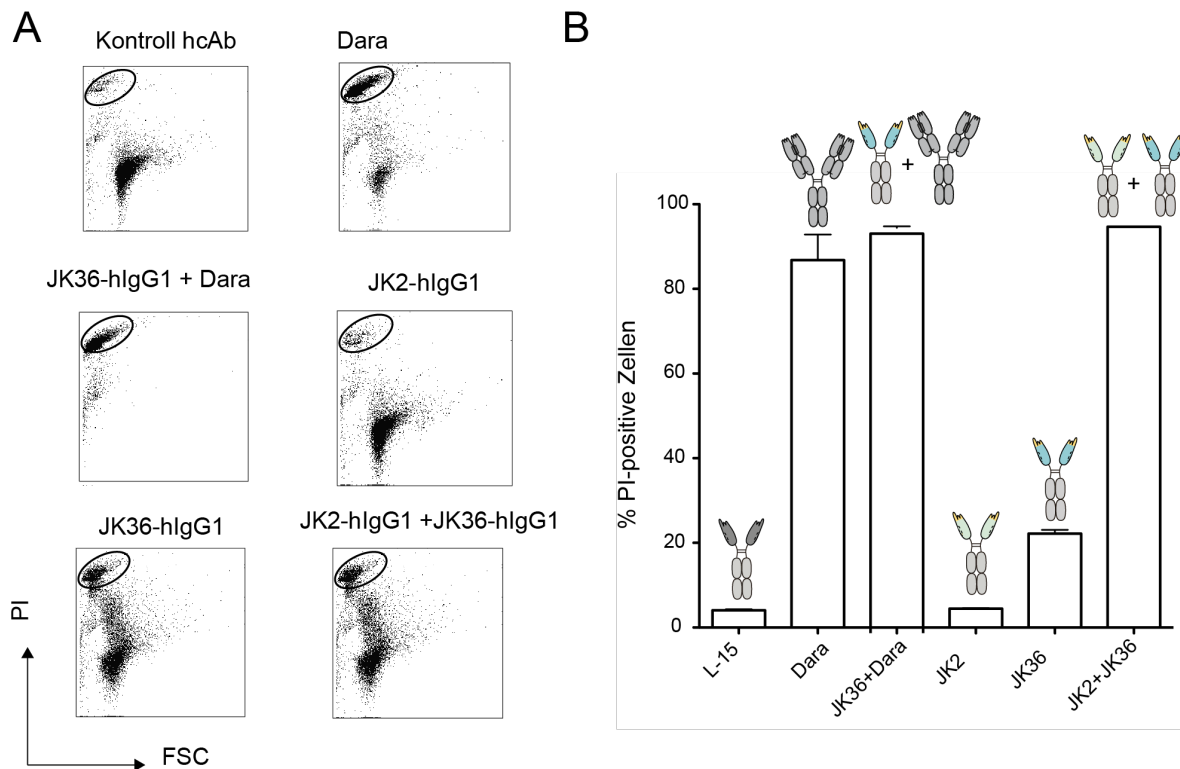


Abbildung 4.2: Monovalente Schwere-Ketten-Antikörper induzieren keine Lyse der Tumorzellen bei der CDC, aber in Kombination erreichen sie eine hohe Effektivität. Nach der Inkubation von Zellen der Tumorzelllinie CA-46 mit Antikörpern und Komplement wurde die Lyse der Zellen durch Durchflusszytometrie gemessen. Als Negativkontrolle diente L-15-hIgG1 und als Positivkontrolle wurde Daratumumab (Dara) verwendet. **(A)** Repräsentative FACS-Plots illustrieren die Gating-Strategie für die Darstellung der PI-positiven Zellen (PI = Propidiumiodid, FSC = forward scatter). **(B)** Balkendiagramme zeigen die Prozentzahl der PI-positiven Zellen in den Proben (n = 3), die mit einzelnen hcAbs oder mit einer Kombination von hcAbs (Bindung verschiedener Epitope) behandelt wurden.

JK36-hlgG1 ermöglichte bei der CDC nur eine schwache Lyse. Die einzelnen hcAbs JK2-hlgG1 und L-15-hlgG1 führten zu keiner Lyse bei der CDC. Das biparatopische Targeting eine gute Effektivität in der CDC zeigt wurde bereits in Vorarbeiten publiziert (Schütze et al., 2018). Im nächsten Experiment sollten die Tumorzellen hinsichtlich ihrer Sensitivität bei der CDC verglichen werden.

4.2.2 Die CD38-exprimierenden Tumorzelllinien unterscheiden sich in ihrer Sensitivität bei der CDC

Bei der Expressionsanalyse (**Abb. 4.1**) zeigten die Tumorzellen eine unterschiedliche Expression von CD38. Die Tumorzellen sollten deshalb im nächsten Versuch hinsichtlich ihrer Sensitivität bei der CDC untersucht werden (**Abb. 4.3**)

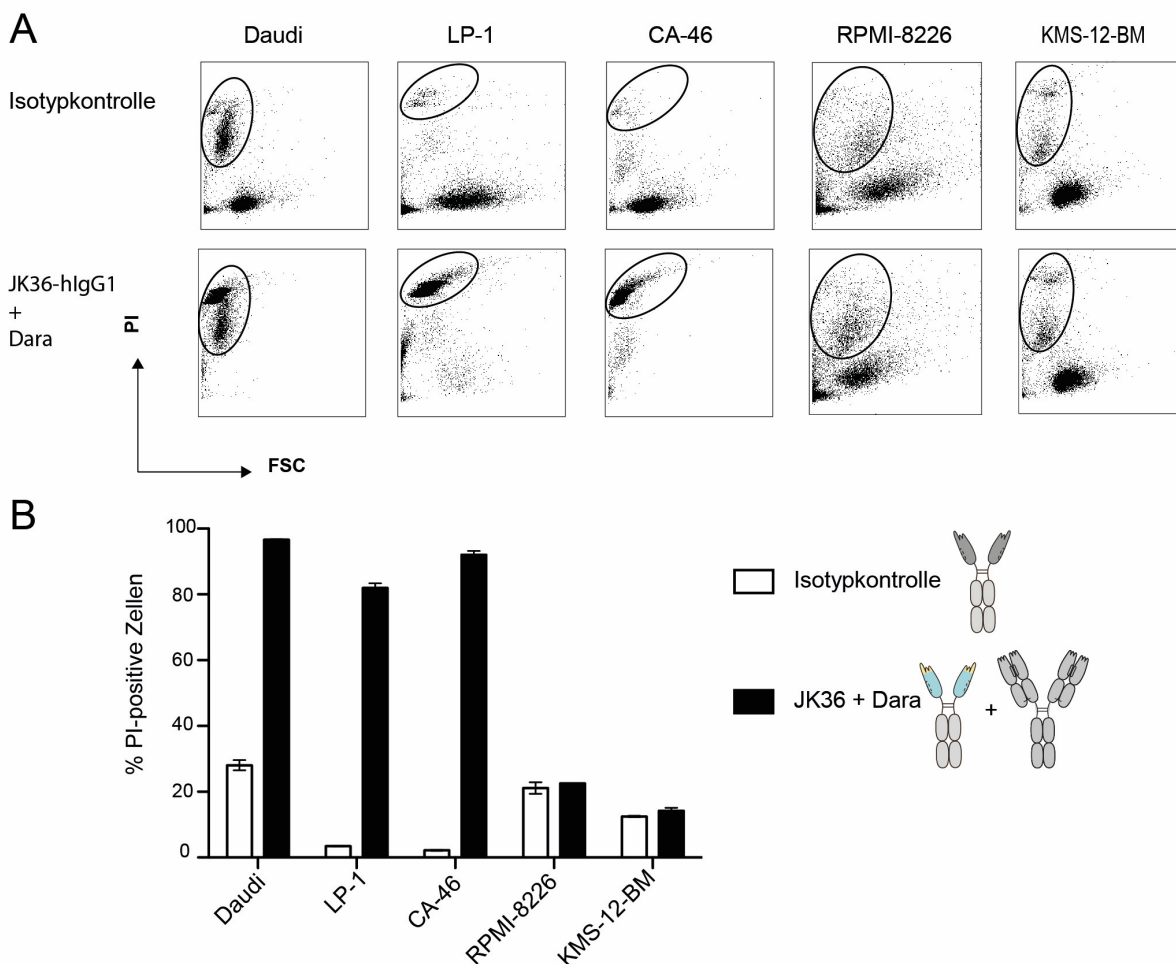


Abbildung 4.3: Die CD38-exprimierenden Tumorzelllinien unterscheiden sich in ihrer Sensitivität bei der CDC. Zellen der Tumorzelllinien Daudi, LP-1, CA-46, RPMI-8226 und KMS-12-BM wurden mit Antikörpern und humanem Serum als Quelle für das Komplement für 90 min bei 37 °C inkubiert. Die Aufnahme von Propidiumiodid wurde durch Durchflusszytometrie gemessen. Die Aufnahme von PI korreliert revers mit der Viabilität der Tumorzellen. **(A)** Repräsentative FACS-Plots illustrieren die Gating-Strategie zur Darstellung der PI-

positiven Zellen (PI = Propidiumiodid, FSC = forward scatter). **(B)** Die Balkendiagramme (n = 3) stellen die Prozentzahl der PI- positiven Zellen dar. L-15-hlgG1 diente als Isotypkontrolle.

Die verschiedenen Tumorzelllinien wurden mit JK36-hlgG1 und Daratumumab und Serum als Quelle von Komplement inkubiert. Als Isotypkontrolle diente der nichtbindende hcAb L-15-hlgG1.

Die Auswertung der Ergebnisse zeigte, dass die Daudi-, LP-1- und CA-46 Zellen sensitiv auf die CDC reagieren. Bei den RPMI-8226 Zellen und auch den KMS-12-BM Zellen trat keine Lyse bei der CDC auf (**Abb. 4.3B**). Anhand der CD38-Expression (**Abb. 4.1**) wurde eine Lyse der RPMI-8226 Zellen erwartet, da sie eine moderate CD38-Expression aufwiesen.

Deshalb sollte im nächsten Experiment die Expression der Komplementinhibitoren CD55 und CD59 gemessen werden.

4.2.3 Die Expression von CD55 und CD59 korreliert mit der Resistenz gegenüber der CDC

Die CD38-Expressionsanalyse und der CDC-Assay führten zum Ergebnis, dass die RPMI-8226 Zellen nicht sensitiv gegenüber der CDC sind. Da die Expression der Komplementinhibitoren CD55 und CD59 zu einer Resistenz gegenüber der CDC führen kann, wurde im nächsten Versuch deren Expression gemessen.

Für die Expressionsanalyse wurden die Tumorzellen mit dem für das jeweilige Oberflächenprotein spezifischen und mit einem Fluorochrom gekoppelten Antikörper inkubiert. Die Expression der Oberflächenmarker wurde dann durch Durchflusszytometrie gemessen.

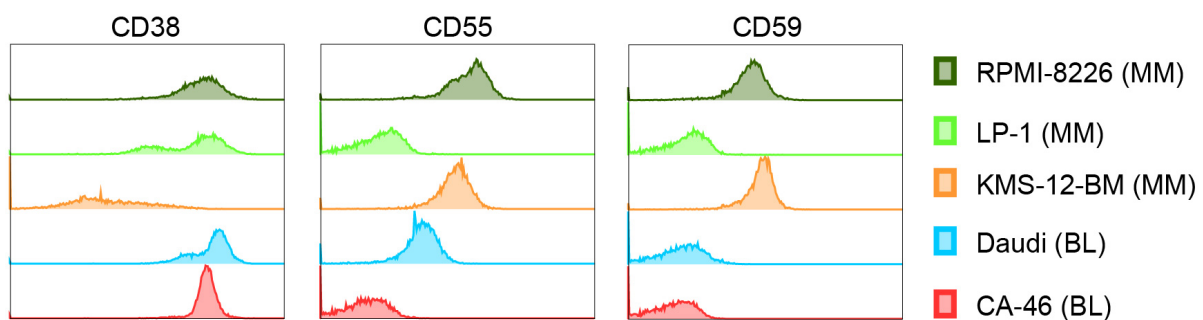


Abbildung 4.4: KMS-12-BM und RPMI-8226 Zellen exprimieren die Komplementinhibitoren CD55 und CD59. Zellen der Tumorzelllinien RPMI-8226, LP-1, KMS-12-BM, Daudi und CA-46 wurden mit einem für das Oberflächenprotein spezifischen und mit einem Flu-

orochrom gekoppelten Antikörper inkubiert. Die Expression der Oberflächenmarker wurde durch Durchflusszytometrie gemessen. Die Stärke der Expression wurde dabei durch die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) dargestellt.

Die RPMI-8226 und KMS-12 BM Zellen zeigten eine deutliche Expression von CD55 und CD59 (**Abb. 4.4**). Die Daudi Zellen wiesen nur eine schwache Expression der Komplementinhibitoren auf und die LP-1 und CA-46 Zellen zeigten gar keine Expression (**Abb. 4.4**). Wegen der Expression von Komplementinhibitoren trat bei den RPMI-8226 Zellen keine Lyse im CDC-Assay auf (**Abb. 4.3**). Die CD38-Expression (**Abb. 4.1**) korreliert also mit der Sensitivität der Tumorzellen gegenüber der CDC (**Abb. 4.3**), während die Expression von CD55 und CD59 mit der Resistenz gegenüber der CDC korreliert. Ähnliche Ergebnisse waren bereits durch Vorarbeiten der Arbeitsgruppe gezeigt worden (Schütze 2021, S. 67).

Im nächsten Experiment wurde untersucht, ob ein biparatopischer und tetravalenter hcAb mit JK2 und JK36 als Einzeldomänen-Antikörper ebenso effektiv eine CDC auslösen kann wie die Kombination von JK2-hIgG1 und JK36-hIgG1.

4.3 Aktivierung der CDC mit tetravalenten und mutagenisierten Schwere-Ketten-Antikörpern

4.3.1 Biparatopische Schwere-Ketten-Antikörper weisen eine gute Effektivität bei der CDC auf

Die Kombination der hcAbs JK2-hIgG1 (E2) und JK36-hIgG1 (E3) führte zu einer vollständigen Lyse bei der CDC (**Abb. 4.2**). Deshalb sollte auch die Kombination von JK2 und JK36 bei einem biparatopischen hcAb im CDC-Assay auf ihre Effektivität untersucht werden. Dabei wurden die CA-46 Zellen mit einem einzelnen hcAb oder der Kombination von zwei hcAbs und Serum für 90 min bei 37 °C inkubiert und dann mit Propidiumiodid gefärbt. Die Analyse wurde auch dabei durch eine Durchflusszytometrie durchgeführt. Der hcAb L-15-hIgG1, der nicht an CD38 bindet, diente als Negativkontrolle und JK36-hIgG1 und Daratumumab wurden als Positivkontrolle verwendet (**Abb. 4.5**).

Der biparatopische hcAb JK2-15GS-JK36-hIgG1 führte zu einer starken Lyse bei der CDC und erreichte dabei eine ebenso starke Effektivität bei der CDC wie JK2-hIgG1

und JK36-hIgG1 und die Positivkontrolle mit JK36-hIgG1 und Daratumumab (**Abb. 4.5**)

Im nächsten Experiment wurde getestet, welchen Einfluss auf die Effektivität bei der CDC die Variation der GS-Linkerlänge eines biparatopischen hcAbs hat.

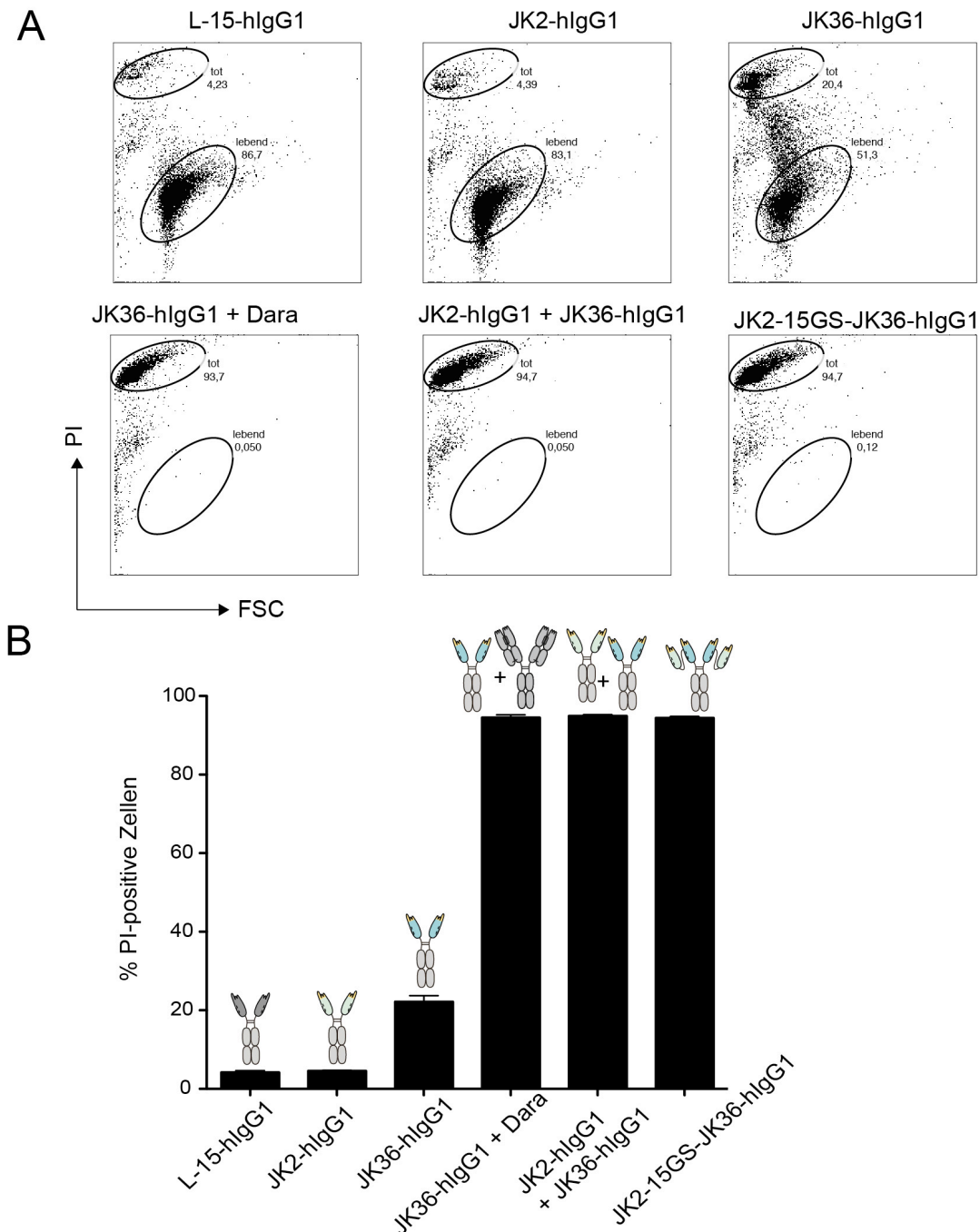


Abbildung 4.5: Biparatopische Schwere-Ketten-Antikörper erreichen bei der CDC eine hohe Effektivität, während einzelne bivalente Schwere-Ketten-Antikörper nur eine geringe oder gar keine Effektivität bei der CDC aufweisen. Myelom-Zellen der CA-46 Tumorzelllinie wurden mit einzelnen hcAbs oder einer Kombination von zwei hcAbs und humanem Serum als Quelle für das Komplement für 1,5 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurden

die Zellen mit Propidiumiodid angefärbt. Die Analyse erfolgte durch Durchflusszytometrie. **(A)** Repräsentative FACS-Plots zur Darstellung der PI-positiven Zellen (PI = Propidiumiodid, FSA = forward scatter); **(B)** Balkendiagramme ($n = 3$) zeigen die Prozentzahl der PI positiven Zellen von Proben, die mit einzelnen hcAbs, einer Kombination von hcAbs (Bindung verschiedener Epitope) oder biparatopischen hcAbs behandelt wurden. Als Negativkontrolle diente L-15-hIgG1 und als Positivkontrolle wurden JK2-hIgG1 und JK-36-hIgG1 verwendet.

4.3.2 Biparatopische Schwere-Ketten-Antikörper mit 5GS-Linkerlänge weisen eine stärkere C1q-Bindung auf als Antikörper mit einer 15GS- und einer 20GS-Linkerlänge

Die biparatopischen Schwere-Ketten-Antikörper mit 5GS-, 15GS- und 20GS-Linkern wurden in einem C1q-Bindungsassay (**Abb. 4.6**) getestet.

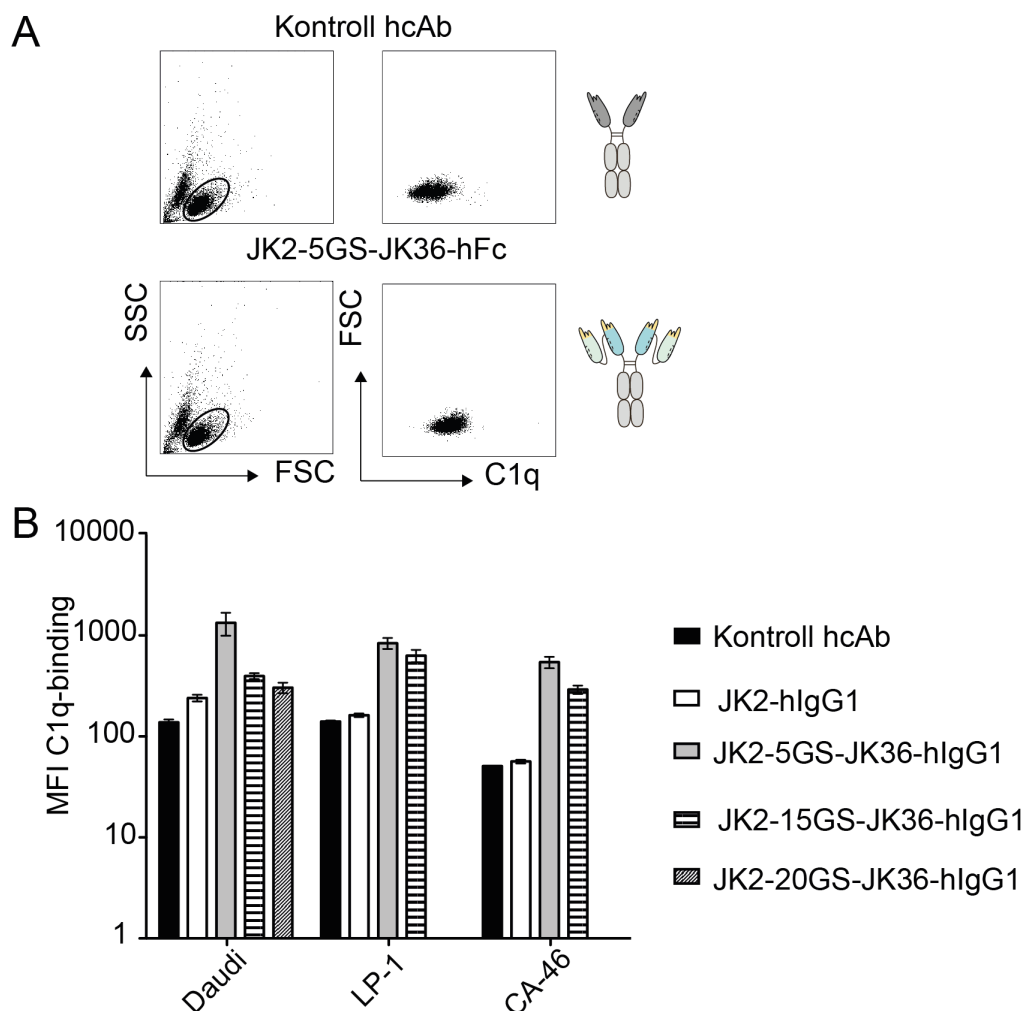


Abbildung 4.6: Biparatopische Schwere-Ketten-Antikörper mit 5GS-Linkerlänge weisen die stärkste C1q-Bindung auf. (A) Daudi-, LP-1 und CA-46 Zellen wurden mit einer sättigenden Menge Antikörper aus dem HEK293 Zell-Überstand und 12,5 % gepooltem, humanen und hitzeinaktivierten Serum als Quelle für C1q für 90 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit einem mit FITC konjugierten anti-C1q-Antikörper gefärbt. Die

Bindung von C1q wurde durch Durchflusszytometrie gemessen (FSC = forward scatter, SSC = side scatter). **(B)** Die Balkendiagramme (n = 3) illustrieren die Bindung von C1q durch die biparatopischen hcAbs mit unterschiedlichen GS-Linkerlängen. Als Negativkontrolle diente L-15-hlgG1 und als Positivkontrolle wurde JK2-15GS-JK36-hlgG1 verwendet.

Bei diesem C1q-Bindungsassay wird die Anfangskaskade einer CDC imitiert, ohne dass eine Zytolyse der Zellen erfolgt. Dafür wurden Tumorzellen verschiedener CD38-exprimierender Zelllinien mit einer sättigenden Menge Antikörper und humanem, gepoolten und inaktivierten Serum inkubiert und danach mit einem mit FITC konjugierten anti-C1q-Antikörper angefärbt. Die C1q-Bindung wurde dann durch Durchflusszytometrie gemessen (**Abb. 4.6B**).

Der biparatopische hcAb mit 5GS-Linkerlänge zeigte die stärkste, der mit 15GS-Linkerlänge zeigte die zweitstärkste und der mit 20GS-Linkerlänge die drittstärkste Bindung von C1q (**Abb. 4.6C**). JK2-hlgG1 wies eine schwache Bindung von C1q auf. L-15-hlgG1 diente als Negativkontrolle und JK2-15GS-JK36-hlgG1 diente als Positivkontrolle.

4.3.3 Fc-Mutationen modulieren die Kapazität biparatopischer Schwereketten-Antikörper bei der CDC

Im nächsten Experiment sollte der Frage nachgegangen werden, ob die Fc-Mutationen ADES und AAG (**Abb. 1.7**) den Effekt eines biparatopischen hcAbs bei der CDC verstärken oder inhibieren können. Dafür wurden die Konstrukte JK2-15GS-JK36-hlgG1 ADES und JK2-15GS-JK36-hlgG1 AAG (**Abb. 1.6**) hergestellt.

Diese Konstrukte wurden dann in einer Verdünnungsreihe mit LP-1 luc Tumorzellen und humanem Serum inkubiert (**Abb. 4.7**). Danach wurde die Biolumineszenz der Zellen mit einem Luminometer gemessen.

Die Fc Variante hlgG1 ADES führte im Vergleich mit der Wildtyp Fc Variante hlgG1 bei einem biparatopischen hcAb und einer sättigenden Menge Antikörper zu einer leichten Verstärkung der CDC. Bei sinkender Antikörper-Konzentration nahm der CDC verstärkende Effekt ab. Die IC₅₀ von JK2-15GS-JK36-hlgG1 ADES war vergleichbar mit der von JK2-15GS-JK36-hlgG1. Die Fc Variante hlgG1 AAG führte zu einem vollständigen Verlust der Effektorfunktion bei der CDC. Der einzelne JK2-hlgG1 löste wie erwartet ebenfalls keine CDC aus. Als Negativkontrolle diente L-15-hlgG1.

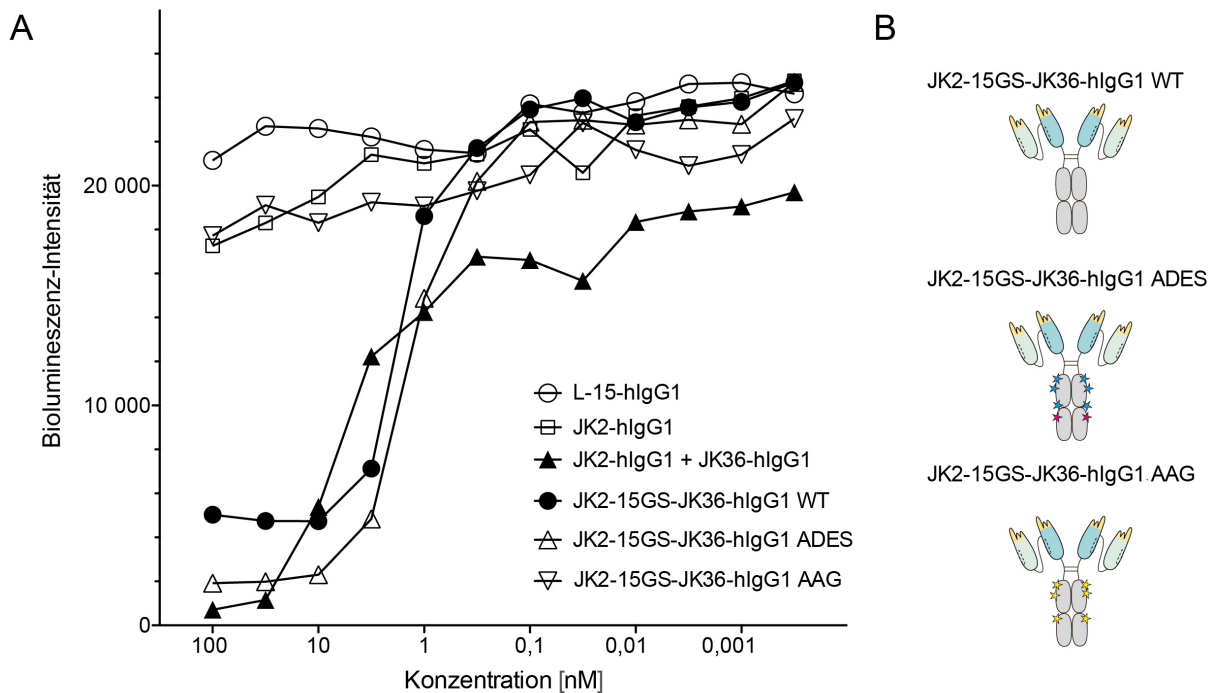


Abbildung 4.7: Fc-Mutationen modulieren die Kapazität biparatopischer Schwere-Ketten-Antikörper bei der CDC. LP-1 luc Myelom-Zellen wurden in einer Verdünnungsreihe mit Antikörpern und Serum für 90 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden dann mit Luciferin Working Solution resuspendiert. Die Biolumineszenz-Intensität der Zellen wurde dann mit einem Luminometer gemessen. Der Wert wurde gemittelt (n = 3). Als Positivkontrolle dienten JK2-hlgG1 und JK36-hlgG1 und als Negativkontrolle wurde L-15-hlgG1 verwendet.

4.4 CD38-spezifische Schwere-Ketten-Antikörper inhibieren die GDP-R-Cyclase-Aktivität von CD38

Für die Identifikation von tetravalenten hcAbs (**Abb.1.6**), die die GDP-R-Cyclase-Aktivität von CD38 verstärken oder inhibieren, wurden CD38-positive HEK293 Zellen mit CD38-spezifischen hcAbs und NGD⁺ bei Raumtemperatur inkubiert (**Abb. 4.8**). NGD⁺ kann nur zu cGDP-R umgesetzt werden, wodurch die isolierte Cyclase-Aktivität von CD38 gemessen werden kann. Die Synthese von cGDP-R wurde durch Fluoreszenzspektroskopie gemessen.

Der biparatopische JK2-15GS-JK36-hlgG1 inhibierte die Cyclase-Aktivität am stärksten (**Abb.4.8A**) und der biparatopische JK36-15GS-JK2-hlgG1 inhibierte die Cyclase-Aktivität am zweitstärksten. Der tetravalente JK2-15GS-JK2-hlgG1 inhibierte die Cyclase-Aktivität etwas schwächer als die beiden biparatopischen hcAbs. Der bivalente JK2-hlgG1 hemmte die Cyclase-Aktivität weniger stark als JK2-15GS-JK2-hlgG1. JK36-hlgG1 hemmte die Cyclase-Aktivität wiederum schwächer als JK2-

hIgG1 (**Abb. 4.8A**). Als Negativkontrolle diente L-15-hIgG1 und als Positivkontrolle wurde JK2-hIgG1 verwendet.

Die Messungen zeigten, dass ein bivalenter hcAb, der an das Epitop 2 bindet, effektiv die Cyclase-Aktivität inhibiert. Wenn dieser in einem biparatopischen und tetravalenten hcAb zusammen mit JK36 kombiniert wurde, der an das Epitop 3 bindet, dann fiel die Inhibition noch stärker aus (**Abb. 4.8B**). Die unterschiedliche Anordnung der Einzeldomänen-Antikörper im bphcAb verweist darauf, dass ein biparatopischer und tetravalenter hcAb mit JK2 als vorderem Einzeldomänen-Antikörper (JK2-15GS-JK36-hIgG1) im Vergleich mit dem Konstrukt mit JK36 an der vorderen Position (JK36-15GS-JK2-hIgG1) mit einer effektiveren Inhibition verbunden ist

Diese Ergebnisse machen deutlich, dass die GDPR-Cyclase-Aktivität von CD38 effektiv durch biparatopische hcAbs inhibiert werden kann (**Abb. 4.8**). Dass die Cyclase-Aktivität von CD38 durch Nbs beeinflusst werden kann, wurde bereits in Vorarbeiten gezeigt (Fumey et al., 2017).

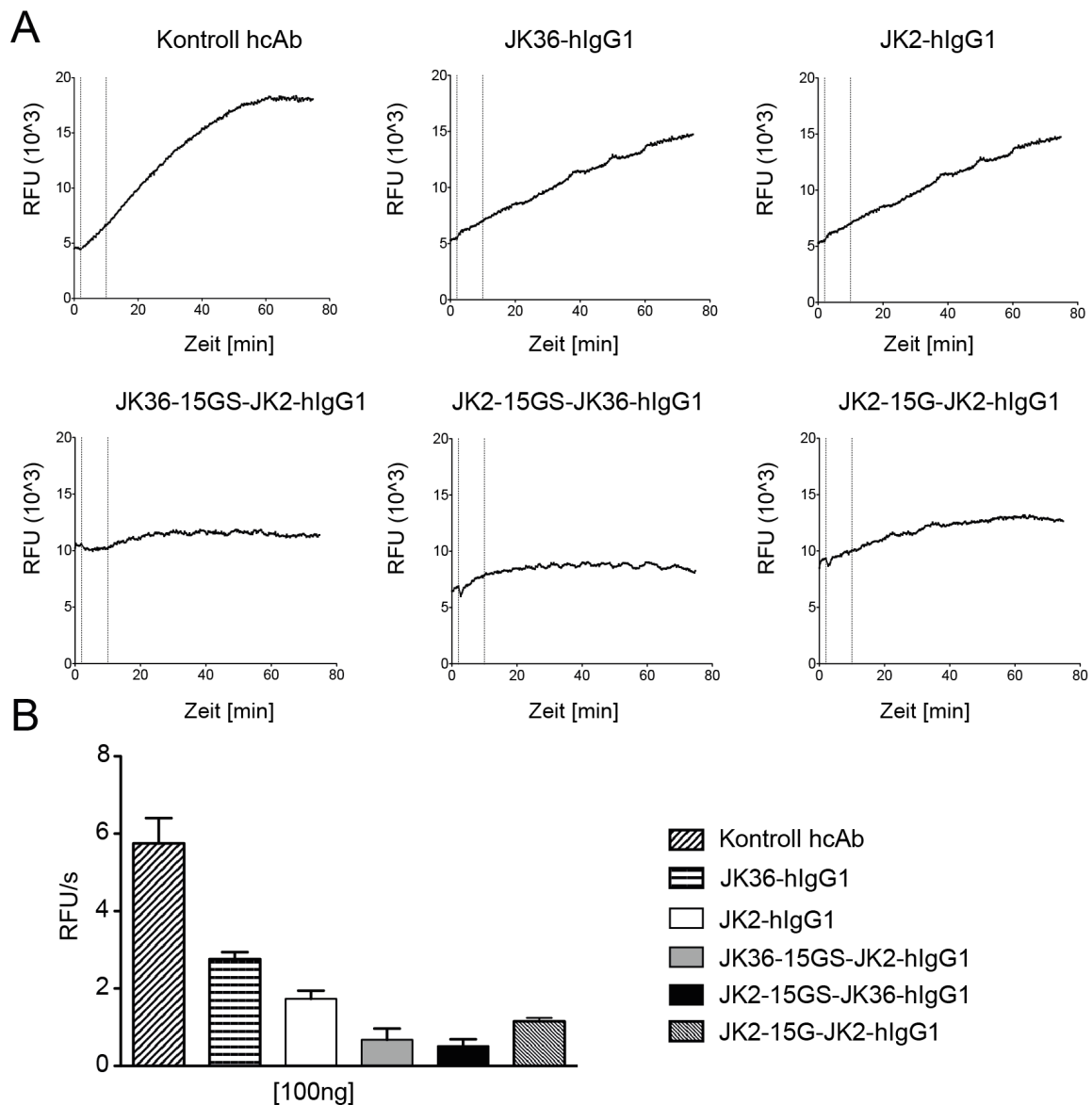


Abbildung 4.8: Der biparatopische hcAb JK2-15GS-JK36-hIgG1 inhibiert die Cyclase-Aktivität von CD38 stark. (A) CD38-positive HEK293 Zellen wurden mit CD38-spezifischen Schwere-Ketten-Antikörpern (100 ng) und NGD⁺ bei Raumtemperatur inkubiert. Die Synthese von zyklischer GDP-Ribose wurde durch Fluoreszenzspektroskopie gemessen (RFU = relative fluorescence units). Die Kurven zeigen die Entwicklung der Fluoreszenzintensität (RFU) über die Zeit bei der Anwesenheit der verschiedenen hcAbs. (B) Bivalente Schwere-Ketten-Antikörper werden in weißen Balkendiagrammen, tetravalente Schwere-Ketten-Antikörper in dunkelgrauen Balkendiagrammen und biparatopische Schwere-Ketten-Antikörper in grauen Balkendiagrammen dargestellt. Sie zeigen die Steigung der Kurven während der linearen Phase an (8. bis 25. min, n = 3). JK2-hIgG1 diente als Positivkontrolle und L-15hIgG1 wurde als Negativkontrolle verwendet.

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit ging es um die Herstellung und Charakterisierung von biparatopischen und CD38-spezifischen hcAbs.

Die Ergebnisse verweisen darauf, dass die biparatopischen hcAbs über eine bessere CDC-Effektivität verfügen als die einzelnen hcAbs. Dies war schon durch Vorarbeiten von Schütze et al. 2018 dargestellt worden. Es konnte gezeigt werden, dass das neue Konstrukt JK2-15GS-JK36-hIgG1 zu einer effektiven Lyse bei der CDC führt. Dabei wurde gezeigt, dass biparatopische hcAbs mit einer Linkerlänge von 5GS *in vitro* die stärkste C1q-Bindung aufweisen. Biparatopische hcAbs mit Linkerlängen von 15GS und 20Gs hatten eine geringere Effektivität bei der CDC. Die Fc Variante hIgG1 ADES führte zu einer leichten Steigerung der Wirkung bei der CDC. Die Fc Variante hIgG1 AAG führte dagegen *in vitro* zu einem Verlust der Effektorfunktion bei der CDC. Außerdem wurde gezeigt, dass biparatopische hcAbs *in vitro* die GDPR-Cyclase-Aktivität von CD38 effektiv inhibieren können.

5.1 Die Effektivität bei der CDC hängt von der Expression von CD38, CD55 und CD59 ab

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden die Tumorzellen von Burkitt- und Myelom-Zelllinien auf ihre CD38-Expression untersucht. Die Zellen zeigten dabei eine unterschiedliche CD38-Expression (**Abb. 4.1**). Die Daudi Lymphom-Zellen erreichten die höchste Expression von CD38, die LP-1 Myelom-Zellen und die CA-46 Lymphom-Zellen erreichten eine mittlere Expression von CD38 und bei den RPMI-8226 Myelom-Zellen ergab sich nur eine geringere Expression von CD38. Die Daudi Lymphom-Zellen mit der höchsten CD38-Expression wurden im Vergleich mit den LP-1 Myelom-Zellen auch weniger stark lysiert. Die Zellen unterscheiden sich daher durch ihre Sensitivität bei der CDC. Die RPMI-8226 Zellen wurden bei der CDC nicht lysiert, obwohl sie CD38 auf ihrer Oberfläche exprimierten. Deshalb wurde die Expression der Komplementinhibitoren CD55 und CD59 analysiert. Die Resistenz der Zellen gegenüber der CDC korrelierte dabei mit der Expression von CD55 und CD59 (Schütze et al., 2018). Die RPMI-8226 Zellen, die bei der CDC trotz CD38-Expression keine Lyse zeigten, exprimierten CD55 und CD59 (**Abb. 4.4**). Durch die-

se Versuche wurden die Ergebnisse vorheriger Arbeiten bestätigt (Schütze et al., 2018).

Die Expression der Komplementinhibitoren CD55 und CD59 ist bereits als ein Mechanismus für die Resistenzentwicklung der Zellen des Multiplen Myeloms bekannt (van de Donk and Usmani, 2018). Auch beim NK-Zell-Lymphom korrelieren die Zunahme von komplement-inhibierenden Proteinen (CIP) und die Abnahme der CD38-Expression mit einem schlechteren Ansprechen auf die Therapie mit Daratumumab. Eine simultane Medikation von All-Trans-Retinoinsäure (ATRA) zur Hochregulation von CD38 und zur Verringerung der CIPs führte *in vitro* zu einer gesteigerter Sensitivität der Tumorzellen gegenüber der CDC bei der Therapie mit Daratumumab (Mustafa et al., 2021). Ein solches Sensibilisieren der Tumorzellen mit ATRA als Ko-Therapeutikum wäre auch bei der Behandlung mit CD38-spezifischen hcAbs möglich und könnte auch *in vitro* an Tumorzelllinien getestet werden.

5.2 Die Modifikation biparatopischer Schwere-Ketten-Antikörper und ihre Effektivität bei der CDC

Im zweiten Teil der Arbeit wurden modifizierte biparatopische hcAbs untersucht. Dabei wurden die biparatopischen hcAbs JK2-15GS-JK36-hIgG1, JK36-15GS-JK2-hIgG1, JK2-15GS-JK36-hIgG1 ADES und JK2-15GS-JK36-hIgG1 AAG hergestellt (**Abb. 1.6**). Außerdem wurden die biparatopischen hcAbs JK2-5GS-JK36-hIgG1 und JK2-20GS-JK36-hIgG1 generiert (**Abb. 1.6**). Bivalente hcAbs wiesen keine oder nur eine geringe Zellzytotoxizität bei der CDC auf, aber in Kombination erreichten sie eine hohe Effektivität (**Abb. 4.5**). Der biparatopische hcAb JK2-15GS-JK36-hIgG1, der an die beiden nicht überlappenden Epitope E2 und E3 bindet (**Abb. 5.1**), zeigte eine starke Effektivität bei der CDC (**Abb. 4.5**).

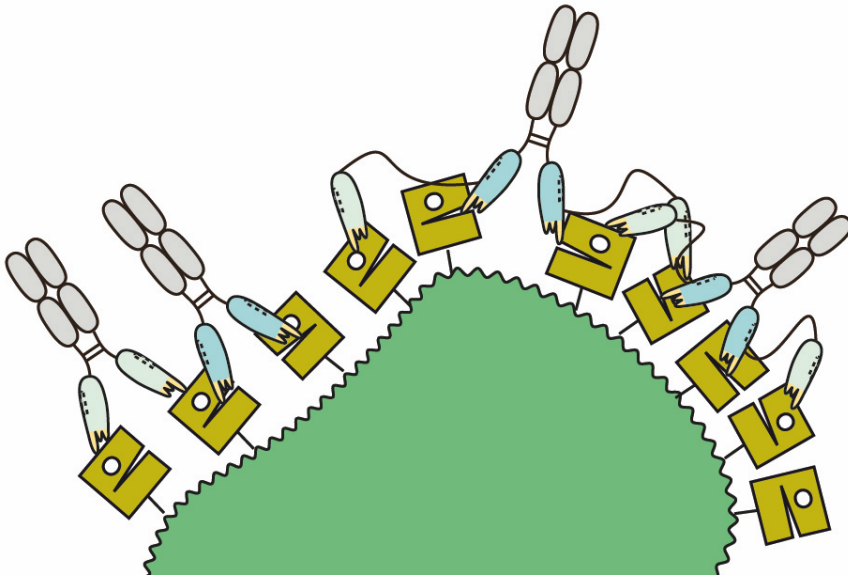


Abbildung 5.1: Die Kreuzvernetzung von CD38 durch einen biparatopischen Schwereketten-Antikörper. Der tetravalente biparatopische hcAb führt zu einer Kreuzvernetzung von CD38. Auch durch die Bindung von bivalenten hcAbs an zwei nicht überlappende Epitope kommt es zu einer Kreuzvernetzung von CD38 auf der Tumorzelle (Schütze et al., 2018). Die mit Adobe Illustrator gestaltete Grafik wurde anhand von Vorlagen von Julia Hambach erstellt und teilweise verändert (Hambach et al., 2020).

Die Ergebnisse der Versuche stützen die Hypothese, dass biparatopische hcAbs durch Kreuzvernetzung von CD38 auf der Tumorzelle besser binden können. Die Versuche konnten auch bestätigen, dass biparatopische hcAbs über eine ähnlich starke Effektivität bei der CDC verfügen (**Abb. 4.5**) wie die Kombination von zwei hcAbs, die an zwei nicht überlappende Epitope binden (Schütze et al., 2018). Durch die Fc-Hexamerisierung wird die Bindung des hexameren C1q-Proteins verstärkt (Diebolder et al., 2014; Jong et al., 2016). Dabei wurde untersucht, wie sich unterschiedliche GS-Linkerlängen eines biparatopischen hcAbs auf die CDC auswirken (**Abb. 4.6**). JK2-5GS-JK36-hIgG1 zeigte in diesem Zusammenhang eine stärkere C1q-Bindung als JK2-15GS-JK36-hIgG1 und JK2-20GS-JK36-hIgG1 (**Abb. 4.6**). Durch kürzere GS-Linker kann es eventuell zu einer besseren Hexamerisierung der Fc-Teile der an die Zelle gebundenen hcAbs kommen, wodurch dann das hexamere Protein C1q besser gebunden werden kann. Bei einer Linkerlänge von 20GS haben die Fc-Teile wahrscheinlich einen größeren Bewegungsspielraum, was dann zu einer schwächeren C1q-Bindung führen könnte (**Abb. 4.6**). Die Hexamerisierung der Fc-Teile ist von entscheidender Bedeutung für eine effiziente C1q-Bindung und die sich anschließende Komplementaktivierung (Wang et al., 2016). Die unterschiedlichen Linkerlängen bieten einen Spielraum bei der Konstruktion von multivalenten hcAbs

oder Nanobodies. Dadurch ergibt sich eine weitere Möglichkeit, die Konstrukte an die zu bindende Struktur anzupassen und zu modifizieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden auch die Auswirkungen von verschiedenen Fc-Mutationen (**Anhang 8.4**) auf die Effektorfunktion der CDC untersucht. Dazu wurden drei verschiedene Fc-Varianten bei der CDC miteinander verglichen. Die Fc-Varianten hlgG1 ADES und hlgG1 AAG (**Abb. 1.7**) wurden bei der CDC getestet. Der biparatopische hcAb JK2-15GS-JK36-hlgG1 ADES führte bei sättigender Menge von Antikörpern im Vergleich mit JK2-15GS-JK36-hlgG1 zu einer leichten Verstärkung der Effektivität bei der CDC (**Abb. 4.7**). Bei den Mutationen G236A, S239D, I332E und E430S konnte aber keine Verbesserung der IC50 erreicht werden. Die Kreuzvernetzung von CD38 und die Hexamerisierung der Fc-Teile wurden bereits durch die biparatopische Valenz verursacht (**Abb. 5.1**) und die Effektivität konnte nur minimal gesteigert werden. Der biparatopische hcAb JK2-15GS-JK36-hlgG1 AAG führte zu keiner Zytolyse bei der CDC, sodass es dabei erwartungsgemäß zu einem Verlust der Effektorfunktion gekommen ist (**Abb. 4.7**).

Das Escape-Risiko von Tumoren könnte deshalb durch biparatopische und bispezifische Konstrukte verringert werden. Rennert et al. konnten zeigen, dass eine CAR-T Zelle mit einer biparatopischen und einer extrazellulären Antigen-bindenden Domäne die Zytotoxizität gegenüber Leukämie-Zellen *in vitro* und *in vivo* steigern kann (Rennert et al., 2021). Die Immunevasion und Tumorerheterogenität können bei biparatopischen und bispezifischen Konstrukten gezielt berücksichtigt werden. Denn dabei können die Konstrukte individuell an die Resistenz und den Phänotyp eines Tumors angepasst werden. Eine Einschränkung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit besteht darin, dass die *in vitro* Versuchen gezeigten Unterschiede hinsichtlich der Effektivität der hcAbs nur einen möglichen Ausblick darauf geben können, wie sich die Konstrukte *in vivo* verhalten werden. Dabei ist es durchaus möglich, dass sich die *in vitro* gezeigte gesteigerte Effektivität von biparatopischen Konstrukten mit 5GS-Linkerlänge nicht *in vivo* durch eine Verbesserung des Gesamtüberlebens, des rezidivfreien Überlebens oder einer signifikanten Reduzierung des Tumorwachstums reproduzieren lässt.

5.3 Modulation der GDPR-Cyclase-Aktivität von CD38 durch biparatopische Schwere-Ketten-Antikörper

Im Tumormikromilieu katalysiert CD38 zusammen mit den Ektoenzymen CD73 und CD203 in einem purinergen Signalweg die Umsetzung von NAD^+ zu immunsuppressivem Adenosin (**Abb. 1.3**) (Horenstein et al., 2019). Die Inhibition der GDPR-Cyclase-Aktivität von CD38 durch CD38-spezifische Nanobodies wurde bereits in früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe gezeigt (Fumey et al., 2017). Fumey et al. konnten nachweisen, dass drei Familien von Nanobodies die GDPR-Cyclase-Aktivität von CD38 inhibieren und zwei Familien die Aktivität stimulieren. Der Nanobody JK2, der an das Epitop 2 von CD38 bindet (**Abb. 1.2**), wurde dabei als stärkster Inhibitor identifiziert und JK36, der an das Epitop E3 (**Abb. 1.2**) bindet, wurde ebenfalls als Inhibitor identifiziert. Adenosin wirkt im Tumormikromilieu immunsuppressiv. Deshalb soll die Metabolisierung von Adenosin im Tumormikromilieu unterdrückt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die beiden Einzeldomänen-Antikörper JK2 und JK36 im tetravalenten und biparatopischen hcAb JK2-15GS-JK36-hIgG1 (**Abb. 1.6**) kombiniert. In einem GDPR-Cyclase-Assay wurde dann die Umsetzung von NGD^+ zu cGDPR durch Fluoreszenzspektroskopie gemessen (**Abb. 4.8**). Die tetravalenten und biparatopischen Schwere-Ketten-Antikörper JK2-15GS-JK36-hIgG1 und JK36-15GS-JK2-hIgG1 haben die GDPR-Cyclase-Aktivität stärker gehemmt als der tetravalente hcAb JK2-15GS-JK2-hIgG1 und der bivalente hcAb JK2-hIgG1 (**Abb. 4.8**). Dabei könnte es zu einer allosterischen Inhibition von CD38 durch die biparatopischen hcAbs kommen (**Abb. 5.2**). Denn für die Anregung der Cyclase-Aktivität benötigt das Enzym CD38 Bewegungsspielraum. Die Konfirmation von CD38 wird durch die Bindung von JK2-15GS-JK36-hIgG1 vermutlich so verändert (**Abb. 5.2**), dass die Cyclisierung von GDPR weniger effektiv umgesetzt werden kann. Wenn etwa eine bestimmte Disulfidbrücke von CD38 aufgebrochen wird, dann kann CD38 zu einer stärkeren Cyclase-Aktivität führen (Malavasi et al., 2008). Dadurch könnte die Hypothese der allosterischen Inhibition durch biparatopische hcAbs gestützt werden, die das Enzym wie eine Art Büroklammer zusammenhalten (**Abb. 5.4**).

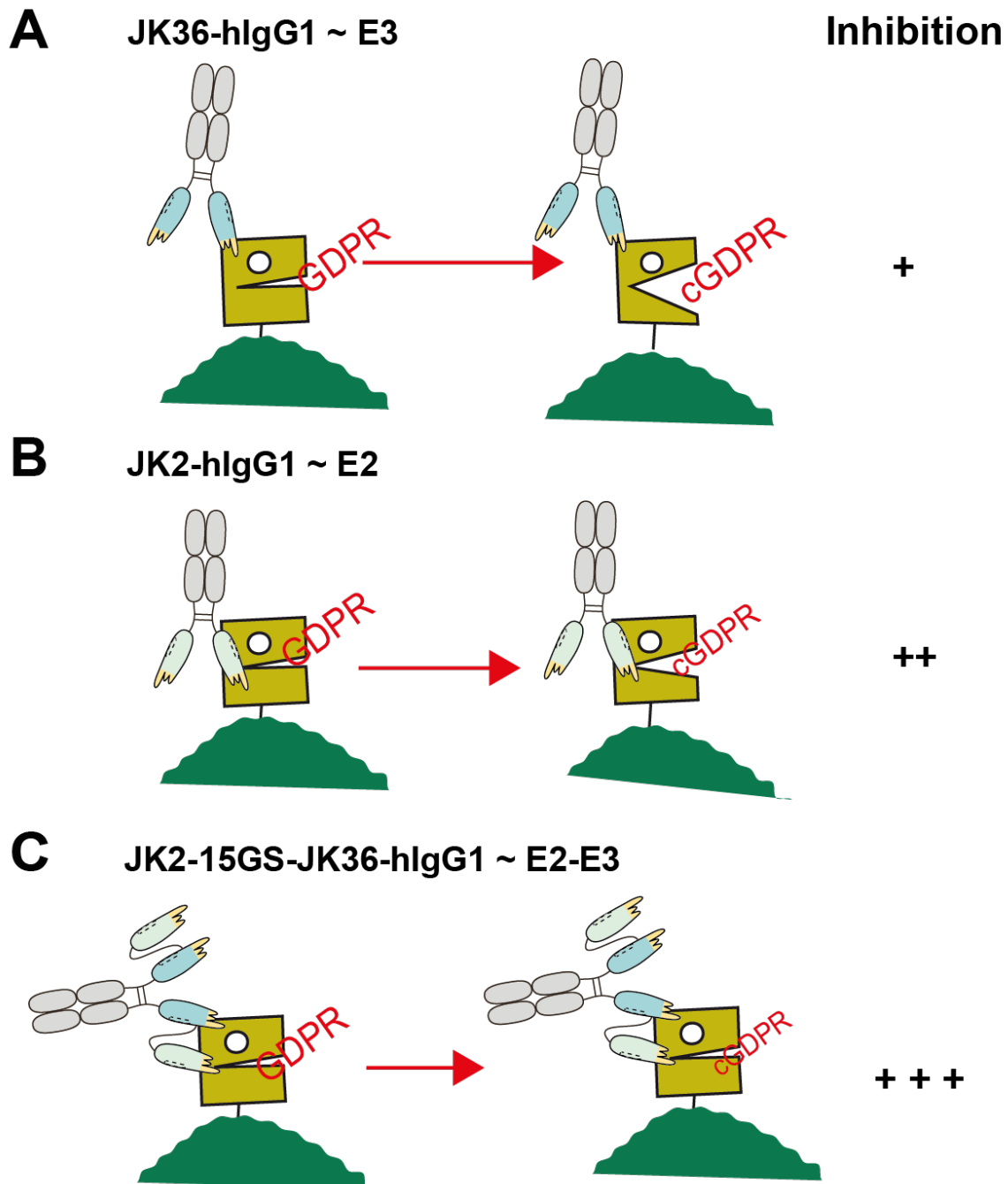


Abbildung 5.2: Der biparatopische Schwere-Ketten-Antikörper JK2-15GS-JK36-hlgG1 bindet an CD38 und hemmt dadurch effektiv die Cyclase-Aktivität. (A) Durch die Bindung von JK36-hlgG1 an das Epitop 3 wird die Cyclase-Aktivität leicht inhibiert. JK36-hlgG1 bindet dabei nicht direkt an das aktive Zentrum des Enzyms. (B) Durch die Bindung von JK2-hlgG1 an das Epitop 2 wird die Cyclase-Aktivität stärker inhibiert. JK2 bindet dabei zumindest in der Nähe des aktiven Zentrums von CD38. (C) Durch die Bindung des biparatopischen hcAbs JK2-15GS-JK36-hlgG1 wird die Cyclase-Aktivität am stärksten inhibiert. Dabei handelt sich um eine allosterische Inhibition. Die mit Adobe Illustrator gestalteten Grafiken wurden anhand von Vorlagen von Julia Hambach erstellt und teilweise verändert.

Der hcAb JK2-15GS-JK36-hlgG1 zeigte eine stärkere Inhibition der GDPR-Cyclase-Aktivität als JK36-15GS-JK2-hlgG1 (**Abb. 4.8**). Die Anordnung der Nanobodies im

hcAb ist also relevant. Dies könnte damit erklärt werden, dass das Epitop von E2 wie eine kleine Höhle etwas versteckt liegt, sodass JK2 am besten daran binden kann, wenn sich der Nanobody an der vorderen Stelle des hcAbs befindet (**Abb. 5.2**). Wie relevant diese Unterschiede in der Valenz eines hcAbs sein können, konnten kürzlich Koenig et al. zeigen. Dabei konnten sie nachweisen, dass durch die Bindung eines multivalenten Nanobodies an die Rezeptorbindungsdomäne des Spike-Proteins das Coronavirus neutralisiert und eine Fusion mit dem ACE-Rezeptor verhindert werden kann (Koenig et al., 2021). In diesem Zusammenhang bleibt allerdings offen, wie sich eine unterschiedliche Anordnung *in vivo* oder in einem 3D-Gewebe-Modell auswirken würde. Der in der vorliegenden Arbeit eingesetzte GDPR-Cyclase-Assay misst die isolierte Cyclase-Aktivität von CD38. Für die Messung der Hydrolase-Aktivität von CD38, bei der es sich um die hauptsächliche Enzymaktivität von humanem CD38 handelt (Zocchi et al., 1993), müsste eine Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) durchgeführt werden. Denn mit einer HPLC können im Unterschied zur Fluoreszenzspektroskopie Substanzen getrennt, identifiziert und einzeln quantifiziert werden. Dadurch könnte gemessen werden, wie sich der Effekt von CD38-spezifischen hcAbs auf die Hydrolase-Aktivität auswirkt. Baum et al. konnten durch eine HPLC-Messung zeigen, dass weder Daratumumab noch CD38-spezifische hcAbs die NAD^+ -Hydrolase-Aktivität von murinem CD38 (mCD38) hemmen. Die spezifischen hcAbs hemmten zwar die ADPR-Cyclase, aber nicht die Aktivität der NAD^+ -Hydrolase von mCD38 (Baum et al., 2020). Durch eine Hemmung der Hydrolase könnte aber der Hauptweg der Produktion von immunsuppressivem Adenosin im Tumormikromilieu gehemmt werden. Allerdings wurden in der Arbeit von Baum et al. keine biparatopischen hcAbs eingesetzt. An Isatuximab wurde jedenfalls gezeigt, dass eine Hemmung der Hydrolase-Aktivität durch einen CD38-spezifischen Antikörper möglich ist. Isatuximab ist ein CD38-spezifischer humaner monoklonaler und konventioneller Antikörper, der für die Therapie des refraktären MMs zugelassen ist. Isatuximab hemmt im Unterschied zu Daratumumab auch die Hydrolase-Aktivität von CD38 (Martin et al., 2019). Es bindet dabei an das Epitop E3 von CD38 (Abbildung 5.1). An dieses Epitop von CD38 bindet auch JK36. In diesem Zusammenhang bleibt die Frage offen, ob die biparatopischen hcAbs JK2-15GS-JK36-hIgG1 und JK36-15GS-JK2-hIgG1 über die Fähigkeit verfügen, die Hydrolase-Aktivität von CD38 hemmen zu können. Dadurch wäre es möglich zu zeigen, ob biparatopische hcAbs

einen weiteren Antitumormechanismus besitzen, durch den sie die Produktion von immunsuppressivem Adenosin im Tumormikromilieu hemmen könnten.

5.4 Anwendungsperspektiven für biparatopische Schwere-Ketten-Antikörper

Die Immuntherapie hat in den letzten Jahren an Relevanz und Präsenz zugenommen. Die seit August 2021 zugelassene Anti-BCMA-CAR-T-Zelle Idecabtagen vicleucel verdeutlicht die Brisanz von biparatopischen Konstrukten (Raje et al., 2019).

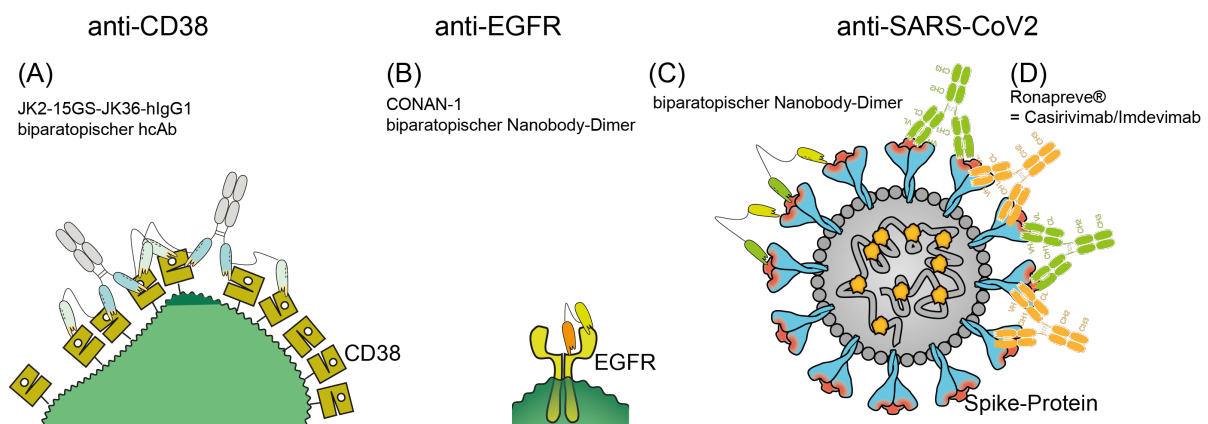


Abbildung 5.3: Biparatopische Konstrukte binden ihr Zielantigen an unterschiedliche Epitope, wodurch die Immunevasion reduziert und auf die Heterogenität der Zielantigene eingegangen werden kann. (A) Ein biparatopischer und CD38-spezifischer hcAb bindet an CD38 auf einer Myelom-Zelle. Dabei kommt es zur Kreuzvernetzung von CD38 auf der Myelom-Zelle. Außerdem können dadurch effektiv Effektormechanismen wie die CDC ausgelöst werden. (B) Ein biparatopisches Rezeptor-Bindungs-Domänen-spezifisches Nanobody-Dimer bindet an das Spike-Protein von SARS-CoV2 und neutralisiert dadurch das Virus (Koenig *et al.*, 2021). (C) Die monoklonalen Antikörper Casirivimab und Imdevimab binden als das Kombinationspräparat Ronapreve® biparatopisch an das SARS-CoV2 Spike-Protein und neutralisieren auf diese Weise das Virus. Die mit Adobe Illustrator gestalteten Grafiken wurden anhand von Vorlagen von Julia Hambach erstellt und teilweise verändert (Hambach et al., 2020).

Im Rahmen der Covid-19-Pandemie konnten Xu et al. zeigen, dass multivalente Nanobodies Sars-CoV2-Viren *in vivo* neutralisieren können (Xu et al., 2021). Koenig et al. konnten nachweisen, dass biparatopische Nanobodies Coronaviren neutralisieren und Escape-Mutationen verhindern können (Koenig et al., 2021). Die Zulassung der rekombinanten monoklonalen Antikörper Casirivimab und Imdevimab als das Kombinationspräparat Ronapreve® greift die Thematik des biparatopischen Targetings auf. Casirivimab und Imdevimab binden nicht-kompetitiv an zwei unterschiedliche Epitope des Spike-Proteins von SARS-CoV2 (**Abb. 5.3**). Bei Ronapreve® handelt es sich

also um ein Kombinationspräparat, das über ein biparatopisches Targeting wirkt. Die Herstellung von biparatopischen monoklonalen Antikörper ist allerdings schwierig. Vielleicht werden deshalb die beiden monoklonalen Antikörper als Kombinationspräparat verabreicht. Biparatopische hcAbs können dagegen leicht und effizient hergestellt werden, wie es in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde.

6 Zusammenfassung

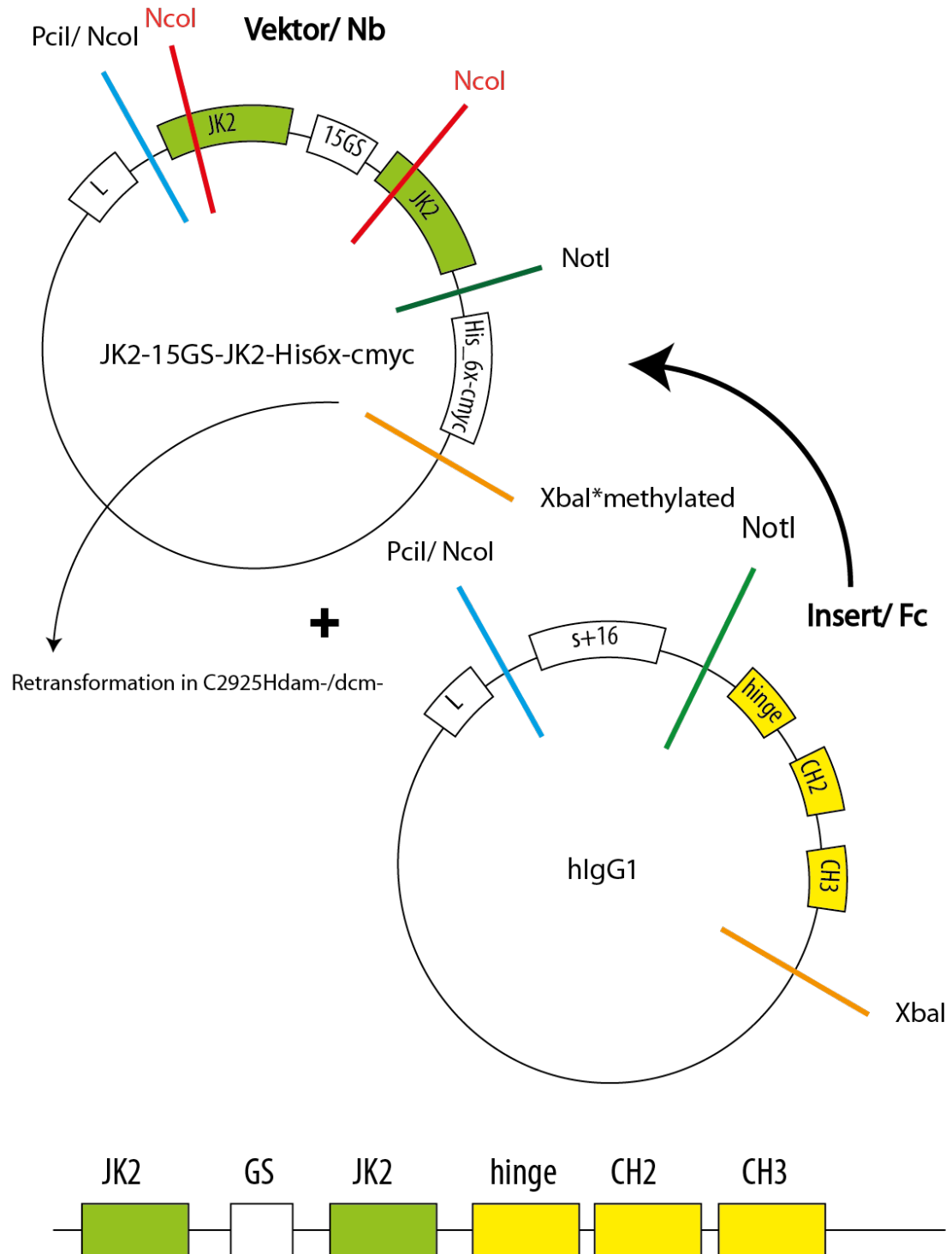
Das Multiple Myelom ist eine hämatologische Erkrankung, bei der Tumorzellen das Oberflächenprotein CD38 überexprimieren. Trotz der Fortschritte in der Immuntherapie haben Myelom-Patient:innen nach wie vor eine schlechte Prognose. Eine Alternative zu monoklonalen Antikörpern bieten auf Nanobodies basierende Schwereketten-Antikörper, die lediglich aus zwei schweren Ketten bestehen. Sie ermöglichen eine bessere Gewebepenetration und eine leichtere genetische Modifikation. Die antigenbindende Domäne (Nanobody) von Schwereketten-Antikörpern kann wegen ihrer guten Löslichkeit und hohen Stabilität leichter in bi- und multi-spezifischen Konstrukten kombiniert werden als die antigenbindenden Domänen konventioneller Antikörper. In der vorliegenden Arbeit wurden tetravalente und biparatopische CD38-spezifische Schwereketten-Antikörper hergestellt und charakterisiert. Die Fragestellung bestand dabei darin, inwiefern Modifikationen eines biparatopischen hcAbs die Antitumoreffektivität etwa bei der komplementvermittelten Lyse (CDC) *in vitro* steigern können. Im ersten Teil der Arbeit wurden die hcAbs in Plasmidvektoren kloniert und nach einer transienten Transfektion in HEK293-6E Zellen produziert. Die Effekte der Anordnung der Nanobodies, der GS-Linkerlänge und der Fc-Mutationen wurden dann im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit in Zellexperimenten mit Myelom- und Burkitt-Lymphom-Zellen untersucht. Zur Testung der Antitumoreffektivität wurden CDC-Assays verwendet. Biparatopische Konstrukte unterschiedlicher GS-Linkerlänge wurden in C1q-Bindungsassays getestet. Im dritten Abschnitt wurde ein Fluoreszenzassay bei der Anwesenheit der Konstrukte eingesetzt, um eine Inhibition oder Aktivierung der isolierten Cyclase-Aktivität von CD38 durch Schwereketten-Antikörper messen zu können. Im CDC-Assay führten die biparatopischen hcAbs zu einer gesteigerten Effektivität bei der Lyse von LP-1 und CA-46 Tumorzellen. Biparatopische hcAbs mit einer 5-GS-Linkerlänge bewirkten im C1q-Bindungsassay eine stärkere C1q-Bindung als bei einer 15GS- und einer 20GS-Linkerlänge. Fc-Mutationen modulierten die Kapazität biparatopischer hcAbs, Tumorzellen durch die CDC zu lysieren. Im Cyclase-Assay inhibierten biparatopische hcAbs die isolierte GPCR-Cyclase-Aktivität von CD38, wobei sich eine spezifische Reihenfolge der Nanobodies ergab. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit können daher als ein wichtiger Schritt auf dem Weg zur Entwicklung von biparatopischen hcAbs als neuer Therapeutika zur Behandlung von CD38-exprimierenden hämatologischen Neoplasien verstanden werden.

7 Abstract

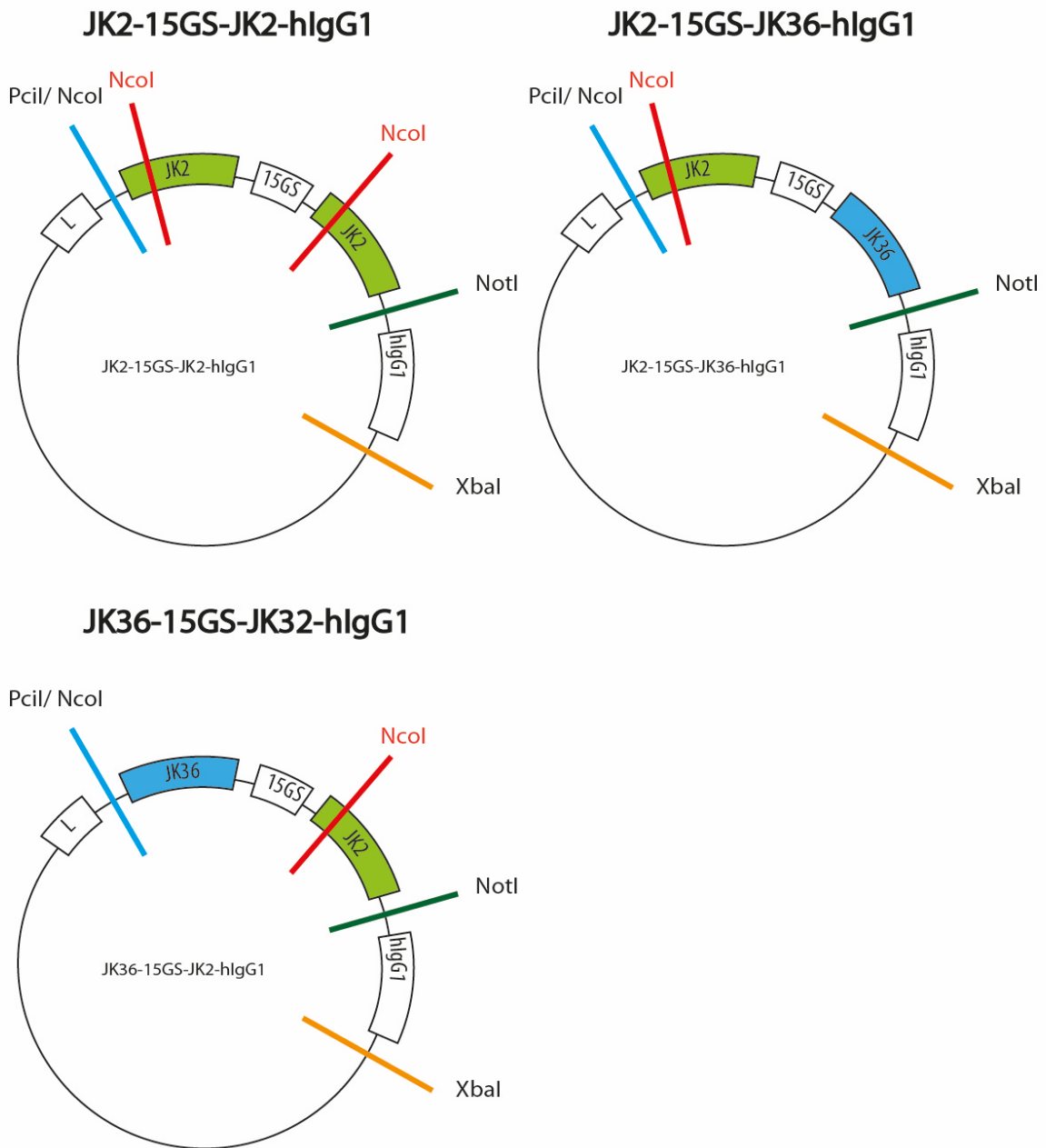
CD38 is an ectoenzyme which is overexpressed in multiple myeloma and other hematologic malignancies. Despite the development of immunotherapies, many myeloma patients still have a poor outcome. Heavy-chain antibodies present an alternative to conventional antibodies for the therapy of multiple myeloma. Heavy-chain antibodies contain only two heavy chains and lack the light chains. Due to this they have smaller size and easier genetic modification. The antigen binding domain of hcAbs (nanobody) displays higher solubility and stability than the antigen-binding domains of conventional antibodies. This greatly facilitates the combination of nanobodies into bi- and multispecific antibodies. Aim of this study was to produce and characterize CD38-specific tetravalent biparatopic hcAbs. The experiments address the question how modifications of biparatopic hcAbs modulate their antitumor efficacy *in vitro*. HcAbs were cloned in plasmids. After transient transfection they were produced in HEK293-6E cells. Biparatopic hcAbs with different arrangement of Nanobodies, GS linker length and Fc mutations were tested *in vitro*. CDC-Assays were performed with myeloma and lymphoma cell lines to test effector function efficacy. Biparatopic hcAbs with different GS linker length were tested in C1q binding assay. GDPR-cyclase assay was performed to evaluate the capacity of hcAbs to modulate the cyclase activity of CD38. Biparatopic hcAbs showed high efficacy in CDC compared to hcAbs targeting only one epitope of CD38. Biparatopic hcAbs with 5GS linker length showed stronger C1q binding compared to hcAbs with 15GS and 20GS linker length. Fc mutations modulate the capacity of hcAbs to kill tumor cells via CDC. Biparatopic hcAbs effectively inhibit the isolated GDPR-cyclase activity of CD38 with different arrangement of Nanobodies showing different strength of inhibition. The results provide a basis for developing biparatopic hcAbs as therapeutics for CD38-expressing hematological malignancies.

8 Anhang

8.1 Klonierungsstrategie



8.2 Plasmidkarten



8.3 DNA-Sequenzen tetravalenter Schwere-Ketten-Antikörper

JLR1 (JK2-15GS-JK2-hlgG1)

MSQVQLQESGGGLVQPGGSLRLS**C**VG**SERIFSRNT**MGWYRQAPGK**QR**ELVGYVG
SMGITNYADSVKGRFTISSDNAKNTIYLQMNLLKPEDTAVYY**C**NY**WHYAAGR**DYW
 GQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGG**S**MAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLS**C**VG**S**
ERIFSRNTMGWYRQAPGK**QR**ELVGYV**GS****MGIT**NYADSVKGRFTISSDNAKNTIYLQ
 MNLLKPEDTAVYY**C**NY**WHYAAGR**DYWGQGTQVTVSS**EPKTPKPQP**
AAADKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEVTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS
LSLSPGK**

JLR2 (JK2-15GS-JK36-hlgG1)

MSQVQLQESGGGLVQPGGSLRLS**C**VG**SERIFSRNT**MGWYRQAPGK**QR**ELVGYVG
SMGITNYADSVKGRFTISSDNAKNTIYLQMNLLKPEDTAVYY**C**NY**WHYAAGR**DYW
 GQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGG**S**MAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLS**CAAS**
GIILRIYDMGWYRQAPGK**QR**ELVA**ITSR**GSTNYADSVKGRFTISRDN**AENTVSLQ**
 MNSLKP**GD**TAVYY**C****NADHTFAGVY**WGQGTQVTVSS**EPKTPKPQP**
AAADKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEVTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS
LSLSPGK**

JLR3 (JK36-15GS-JK2-hlgG1)

MSQVQLQESGGGLVQPGGSLRLS**CAAS****GIILRIYD**MGWYRQAPGK**QR**ELVA**ITSR**
GSTNYADSVKGRFTISRDN**AENTVSLQ**MNSLKP**GD**TAVYY**C****NADHTFAGVY**WGQ
 TQVTVSSGGGGSGGGGSGGGG**S**
 MA
 QVQLQESGGGLVQPGGSLRLS**C**VG**SERIFSRNT**MGWYRQAPGK**QR**ELVGYV**GS**
MITNYADSVKGRFTISSDNAKNTIYLQMNLLKPEDTAVYY**C**NY**WHYAAGR**DYWGQ
 GTQVTVSS
EPKTPKPQP
AAADKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEVTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS
LSLSPGK**

JLR4 (JK36-15GS-JK36-hlgG1)

MSQVQLQESGGGLVQPGGSLRLS**CAAS****GIILRIYD**MGWYRQAPGK**QR**ELVA**ITSR**
GSTNYADSVKGRFTISRDN**AENTVSLQ**MNSLKP**GD**TAVYY**C****NADHTFAGVY**WGQ
 TQVTVSSGGGGSGGGGSGGGG**S**MAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLS**CAAS****GIILRI**
YDMGWYRQAPGK**QR**ELVA**ITSR**GSTNYADSVKGRFTISRDN**AENTVSLQ**MNSL
 K**PGD**TAVYY**C****NADHTFAGVY**WGQGTQVTVSS**EPKTPKPQP**
AAADKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEVTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS
LSLSPGK**

Vektor: pCSE2.5_hlgG1Fc

CDR1

CDR2

CDR3

Deletion/ Insertion: vH/vL Interface

15-GS-Linker

Hinge

hlgG1 Fc

8.4 DNA-Sequenzen der hlgG1 Fc-Varianten

„hlgG1“

NotI

AAASDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEVTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS
LSLSPGK** XbaI

„hlgG1ADES“ ++ G236A S239D I332E ADCC activating E430S CDC
enhancing

NotI

AAASDKTHTCPPCPAPPELLAGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHESALHNHYTQK
LSLSPGK** XbaI

„hlgG1AAG“ L234A L235A, P329G ADCC + CDC knock down

NotI

AAASDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEVTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT
QKLSLSPGK** XbaI

NotI in frame AAA

Stop Stop-Xba unmethyliert

C220S Cystein in oberer Hinge

G236A S239D I332E ADCC activating E430S CDC enhancing

AAG L234A L235A, P329G ADCC + CDC knock down

Abkürzungsverzeichnis

A2A-R	Adenosin-2A-Rezeptor
ADCC	Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (<i>antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i>)
ADCP	Antikörperabhängige zellvermittelte Phagozytose (<i>antibody-dependent cellular phagocytosis</i>)
Adenosin-R	Adenosin-Rezeptor
ADP	Adenosindiphosphat
ADPR	Adenosindiphosphatribose
AL-Amyloidose	Leichtketten-Amyloidose
AMP	Adenosin-Monophosphat
APC	Allophycocyanin
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure (engl. <i>bicinchoninic acid</i>)
BL	Burkitt Lymphom
B-regs	B-regulatorische Zellen
B-Symptomatik	Symptomtrias aus Fieber, Nachtschweiß, Gewichtsverlust
BiTEs	Bispezifische T-Zell-Engager
BSA	Bovines Serumalbumin
bsAbs	Bispezifische Antikörper
cADPR	Zyklische Adenosin-Diphosphat-Ribose
CAR-T-Zellen	Chimäre Antigen-Rezeptor-T-Zellen
CD	Gruppen immunphänotypischer Oberflächenmerkmale von Zellen (<i>Cluster of differentiation</i>)

CDC	Komplementabhängige Zytolyse (<i>Complement Dependent Cytolysis</i>)
CDR	Komplementaritätsbestimmende Region
cGDPR	Zyklische
CRAB-Kriterien	Diagnosekriterien für die Einschätzung des Schweregrades einer monoklonalen Gammopathie (<i>hypercalcaemia, renal insufficiency, anaemia, bone lesions</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
EMA	Europäischen Arzneimittelbehörde
Fc-Region	Fragmentkristallisierbare Region, Domäne eines Antikörpers, die mit Fc-Rezeptoren oder Proteinen Komplementsystems interagiert
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
GC	Glukokortikoid
GDPR	Guanosindiphosphatribose
GS-Linker	Glycerin-Serin-Linker
hcAb	Schwere-Ketten-Antikörper, engl. heavy-chain antibody
HEK Zellen	Humane Embryonale Nierenzellen, engl. human embryonic kidney cells
Ig	Immunglobulin
IgG1	Größte IgG-Subklasse
IL-2	Interleukin 2

IMiD	Immunmodulator (<i>immunomodulatory imide drugs</i>)
IMWG	International Myeloma Working Group
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KM	Knochenmark
mA	Milliampere
MDSC	Myeloide Suppressorzellen (<i>myeloid derived suppressor cells</i>)
MM	Multiples Myelom
MGUS	Monoklonalen Gammopathie unklarer Signifikanz
MWCO-Wert	Wert, der die minimale Molekülmasse eines globulären Moleküls angibt, dass noch durch eine bestimmte Membran passt
NAD ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
Nb	Nanobody
NKT-Zelle	Natürliche-Killer-T-Zelle
NHL	Non-Hodgin-Lymphom
P2X-R	Purinorezeptore, die auf Bindung von ATP reagieren
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PI	Propidiumiodid
PI	Proteasom-Inhibitoren
PE	Phycoerythrin
PEI	Polyethylenimin
RFU	Relative Fluoreszenzeinheiten (engl. <i>relative fluorescence units</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>revolutions per minute</i>)

SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TAA	Tumorassoziiertes Antigen
Tc-Zellen	Zytotoxische T-Zellen
TH-Zellen	T-Helferzellen
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
T-regs	T-regulatorische Zellen
UV	Ultraviolett
V	Volt
V _H	Variable Domäne der schweren Kette
V _{HH}	Nanobody, variable Domäne der schweren Kette von Schwere-Ketten-Antikörpern (<i>variable domain of heavy chain of heavy chain antibodies</i>)
V _L	Variable Domäne der leichten Kette

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: 3D-Struktur des Ektoenzym CD38.	11
Abbildung 1.2: Die extrazelluläre Domäne von CD38 verfügt über drei nicht überlappende Epitope.	12
Abbildung 1.3: CD38 katalysiert zusammen mit den Ektoenzymen CD203 und CD73 im Tumormikromilieu die Synthese von immunosuppressivem Adenosin aus Nikotinadenindinukleotid (NAD ⁺).	13
Abbildung 1.4: Die komplementvermittelte Zytotoxizität (CDC) ist ein Fc-abhängiger Effektormechanismus.	14
Abbildung 1.5: Schwere-Ketten-Antikörper bestehen im Unterschied zu konventionellen Antikörpern nur aus zwei schweren Ketten.	15
Abbildung 1.6: Schwere-Ketten-Antikörper können durch eine Veränderung der Einzeldomänen-Antikörper, der GS-Linkerlänge und der Fc-Teile modifiziert werden.	17
Abbildung 1.7: Schwere-Ketten-Antikörper entstehen durch die Fusion von Einzeldomänen-Antikörpern mit der Hinge-Region und dem Fc-Teil eines konventionellen Antikörpers.	18
Abbildung 4.1: Myelom-Zellen und Burkitt-Lymphom-Zellen weisen eine unterschiedlich starke Expression von CD38 auf.	38
Abbildung 4.2: Monovalente Schwere-Ketten-Antikörper induzieren keine Lyse der Tumorzellen bei der CDC, aber in Kombination erreichen sie eine hohe Effektivität.	39
Abbildung 4.3: Die CD38-exprimierenden Tumorzelllinien unterscheiden sich in ihrer Sensitivität bei der CDC.	40
Abbildung 4.4: KMS-12-BM und RPMI-8226 Zellen exprimieren die Komplementinhibitoren CD55 und CD59.	41
Abbildung 4.5: Biparatopische Schwere-Ketten-Antikörper erreichen bei der CDC eine hohe Effektivität, während einzelne bivalente Schwere-Ketten-Antikörper nur eine geringe oder gar keine Effektivität bei der CDC aufweisen.	43
Abbildung 4.6: Biparatopische Schwere-Ketten-Antikörper mit 5GS-Linkerlänge weisen die stärkste C1q-Bindung auf.	44

Abbildung 4.7: Fc-Mutationen modulieren die Kapazität biparatopischer Schwere-Ketten-Antikörper bei der CDC.	46
Abbildung 4.8: Der biparatopische hcAb JK2-15GS-JK36-hIgG1 inhibiert die Cyclase-Aktivität von CD38 stark.	48
Abbildung 5.1: Die Kreuzvernetzung von CD38 durch einen biparatopischen Schwereketten-Antikörper.	51
Abbildung 5.2: Der biparatopische Schwere-Ketten-Antikörper JK2-15GS-JK36-hIgG1 bindet an CD38 und hemmt dadurch effektiv die Cyclase-Aktivität.	54
Abbildung 5.3: Biparatopische Konstrukte binden ihr Zielantigen an unterschiedliche Epitope, wodurch die Immunevasion reduziert und auf die Heterogenität der Zielantigene eingegangen werden kann.	56

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1:	Antikörper	20
Tabelle 2.2:	Chemikalien.....	20
Tabelle 2.3:	DNA-Oligonukleotide (Primer).....	22
Tabelle 2.4:	Plasmide.....	22
Tabelle 2.5:	DNA-Standards	22
Tabelle 2.6:	Enzyme	22
Tabelle 2.7:	Eukaryotische Zellen	23
Tabelle 2.8:	Laborgeräte	23
Tabelle 2.9:	Lösungen.....	24
Tabelle 2.10:	Medien.....	24
Tabelle 2.11:	Prokaryotische Zellen.....	24
Tabelle 2.12:	Proteinstandards	25
Tabelle 2.13:	Reagenzsysteme.....	25
Tabelle 2.14:	Software	25
Tabelle 3.1:	Ansatz für den Restriktionsverdau	28

Literaturverzeichnis

- Abe, Y. and Ishida, T. 2019. Immunomodulatory drugs in the treatment of multiple myeloma'. *Japanese Journal of Clinical Oncology*. 49(8), pp. 695–702. Available at: <https://doi.org/10.1093/jjco/hyz083>
- Asaadi, Y. et al. 2021. A comprehensive comparison between camelid nanobodies and single chain variable fragments. *Biomarker Research*. 9(1), p. 87. Available at: <https://doi.org/10.1186/s40364-021-00332-6>
- Ayazpoor, U. 2018. Multiples Myelom: Was frontline, wenn Transplantation nicht infrage kommt?. *Im Focus Onkologie*, 21(12), pp. 80–80. Available at: <https://doi.org/10.1007/s15015-018-4395-y>
- Bannas, P. and Koch-Nolte, F. 2018. Perspectives for the Development of CD38-Specific Heavy Chain Antibodies as Therapeutics for Multiple Myeloma. *Frontiers in Immunology*, 9, p. 2559. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02559>
- Basher, F., Paul, Y. and Hoffman, J.E. 2020. Clinical Outcomes in Relapsed/Refractory Multiple Myeloma Patients Receiving Sequential Elotuzumab and Daratumumab: A Single Center Experience', *Blood*, 136(Supplement 1), p. 24. Available at: <https://doi.org/10.1182/blood-2020-142923>
- Baum, N. et al. 2020. Daratumumab and Nanobody-Based Heavy Chain Antibodies Inhibit the ADPR Cyclase but not the NAD⁺ Hydrolase Activity of CD38-Expressing Multiple Myeloma Cells', *Cancers*, 13(1), p. E76. Available at: <https://doi.org/10.3390/cancers13010076>
- Böldicke, T. 2021. Immuntherapie mit Antikörpern: Tumorentwicklung, Immunabwehr und therapeutische Antikörper. *Der Onkologe*, 27(4), pp. 367–375. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00761-020-00895-3>
- Bridoux, F. et al. 2021. Management of acute kidney injury in symptomatic multiple myeloma', *Kidney International*, 99(3), pp. 570–580. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.kint.2020.11.010>

- Chim, C.S. et al. 2018. Management of relapsed and refractory multiple myeloma: novel agents, antibodies, immunotherapies and beyond. *Leukemia*, 32(2), pp. 252–262. Available at: <https://doi.org/10.1038/leu.2017.329>
- Costa, F., Dalla Palma, B. and Giuliani, N. 2019. CD38 Expression by Myeloma Cells and Its Role in the Context of Bone Marrow Microenvironment: Modulation by Therapeutic Agents. *Cells*, 8(12), p. 1632. Available at: <https://doi.org/10.3390/cells8121632>
- Diebolder, C.A. et al. 2014. Complement Is Activated by IgG Hexamers Assembled at the Cell Surface. *Science*, 343(6176), pp. 1260–1263. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1248943>
- Donk, N.W.C.J. van de et al. 2016. Monoclonal antibodies targeting CD38 in hematological malignancies and beyond. *Immunological Reviews*, 270(1), pp. 95–112. Available at: <https://doi.org/10.1111/imr.12389>
- Donk, N.W.C.J. van de, Pawlyn, C. and Yong, K.L. 2021. Multiple myeloma. *The Lancet*, 397(10272), pp. 410–427. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00135-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00135-5)
- van de Donk, N.W.C.J., Richardson, P.G. and Malavasi, F. 2018. CD38 antibodies in multiple myeloma: back to the future. *Blood*, 131(1), pp. 13–29. Available at: <https://doi.org/10.1182/blood-2017-06-740944>
- van de Donk, N.W.C.J. and Usmani, S.Z. 2018. CD38 Antibodies in Multiple Myeloma: Mechanisms of Action and Modes of Resistance. *Frontiers in Immunology*, 9, p. 2134. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02134>
- Eden. 2018. Herstellung und Charakterisierung von Lama Schwere-Ketten-Antikörper produzierenden transgenen Mäusen. Monographie. Fachbereich Biologie, Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften Universität Hamburg. Hamburg. <https://ediss.sub.uni-hamburg.de/handle/ediss/7728>
- Fairfield, H. et al. 2016. Multiple myeloma in the marrow: pathogenesis and treatments. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1364, pp. 32–51. Available at: <https://doi.org/10.1111/nyas.13038>

- Froger, A. and Hall, J.E. 2007. Transformation of Plasmid DNA into E. coli Using the Heat Shock Method. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, (6), p. 253. Available at: <https://doi.org/10.3791/253>
- Fumey, 2021, Herstellung und Fc-Engineering CD38-spezifischer SchwerekettenAntikörper für eine effektivere Zytotoxizität gegenüber Myelomzellen, Monographie, Fachbereich Humanmedizin, Universität Hamburg, Hamburg, <https://e-diss.sub.uni-hamburg.de/bitstream/ediss/9395/1/Dissertation.pdf>
- Fumey, W. et al. 2017. Nanobodies effectively modulate the enzymatic activity of CD38 and allow specific imaging of CD38+ tumors in mouse models in vivo. *Scientific Reports*, 7(1), p. 14289. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14112-6>
- Gandolfi, S. et al. 2017. The proteasome and proteasome inhibitors in multiple myeloma. *Cancer and Metastasis Reviews*, 36(4), pp. 561–584. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10555-017-9707-8>
- Haag, F. et al. 2007. Extracellular NAD and ATP: Partners in immune cell modulation. *Purinergic Signalling*. 3(1–2), p. 71. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11302-006-9038-7>
- Hambach, J. et al. 2020. Targeting CD38-Expressing Multiple Myeloma and Burkitt Lymphoma Cells In Vitro with Nanobody-Based Chimeric Antigen Receptors (Nb-CARs). *Cells*, 9(2), p. 321. Available at: <https://doi.org/10.3390/cells9020321>
- Harousseau, J.-L. 2010. Ten Years of Improvement in the Management of Multiple Myeloma: 2000-2010. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*, 10(6), pp. 424–442. Available at: <https://doi.org/10.3816/CLML.2010.n.076>
- Hayashi, T. et al. 2005. Molecular mechanisms whereby immunomodulatory drugs activate natural killer cells: clinical application. *British Journal of Haematology*, 128(2), pp. 192–203. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2004.05286.x>
- Hogan, K.A., Chini, C.C.S. and Chini, E.N. 2019. The Multi-faceted Ecto-enzyme CD38: Roles in Immunomodulation, Cancer, Aging, and Metabolic Diseases.

- Frontiers in Immunology, 10, p. 1187. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01187>
- Horenstein, A.L. et al. 2016. Adenosine Generated in the Bone Marrow Niche Through a CD38-Mediated Pathway Correlates With Progression of Human Myeloma. *Molecular Medicine*, 22(1), pp. 694–704. Available at: <https://doi.org/10.2119/molmed.2016.00198>
- Horenstein, A.L. et al. 2019. CD38 in Adenosinergic Pathways and Metabolic Reprogramming in Human Multiple Myeloma Cells: In-tandem Insights From Basic Science to Therapy. *Frontiers in Immunology*, 10, p. 760. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00760>
- Horenstein, A.L. et al. 2020. The Circular Life of Human CD38: From Basic Science to Clinics and Back. *Molecules*, 25(20), p. 4844. Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules25204844>
- Jong, R. et al. 2016. A Novel Platform for the Potentiation of Therapeutic Antibodies Based on Antigen-Dependent Formation of IgG Hexamers at the Cell Surface. *PLoS biology*, 14, p. e1002344. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002344>
- Kastritis, E. et al. 2009. Improved survival of patients with multiple myeloma after the introduction of novel agents and the applicability of the International Staging System (ISS): an analysis of the Greek Myeloma Study Group (GMSG). *Leukemia*, 23(6), pp. 1152–1157. Available at: <https://doi.org/10.1038/leu.2008.402>
- Kazandjian, D. 2016. Multiple myeloma epidemiology and survival: A unique malignancy. *Seminars in Oncology*, 43(6), pp. 676–681. Available at: <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2016.11.004>
- Koenig, P.-A. et al. 2021. Structure-guided multivalent nanobodies block SARS-CoV-2 infection and suppress mutational escape. *Science* [Preprint]. Available at: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.abe6230> (Accessed: 3 September 2021)
- Königsdorf. 2016. Selektion, rekombinante Expression und molekulare Charakterisierung CD38-spezifischer Einzeldomänen-Antikörper. Monographie, Fachbereich

- Humanmedizin, Universität Hamburg, Hamburg, <https://ediss.sub.uni-hamburg.de/handle/ediss/7190>
- Krejci, J. et al. 2016. Daratumumab depletes CD38+ immune regulatory cells, promotes T-cell expansion, and skews T-cell repertoire in multiple myeloma. *Blood*, 128(3), pp. 384–394. Available at: <https://doi.org/10.1182/blood-2015-12-687749>
- Kumar, S.K. et al. 2008. Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. *Blood*, 111(5), pp. 2516–2520. Available at: <https://doi.org/10.1182/blood-2007-10-116129>
- Kumar, S.K. et al. 2014. Continued improvement in survival in multiple myeloma: changes in early mortality and outcomes in older patients. *Leukemia*, 28(5), pp. 1122–1128. Available at: <https://doi.org/10.1038/leu.2013.313>
- Kumar, S.K. et al. 2017. Multiple myeloma. *Nature Reviews. Disease Primers*, 3, p. 17046. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.46>
- Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Diagnostik, Therapie und Nachsorge für Patienten mit monoklonaler Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS) oder Multiplem Myelom, Langversion 1.0, 2022, AWMF-Registernummer: 018/035OL, <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/multiples-myelom/> (Zugriff am 12.01.2023)
- Leone, R.D. and Emens, L.A. 2018. Targeting adenosine for cancer immunotherapy. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 6(1), p. 57. Available at: <https://doi.org/10.1186/s40425-018-0360-8>
- 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, R. et al. 2020 Fc-Engineering for Modulated Effector Functions—Improving Antibodies for Cancer Treatment. *Antibodies*, 9(4), p. 64. Available at: <https://doi.org/10.3390/antib9040064>

- Ma, H. and O’Kennedy, R. 2015 The Structure of Natural and Recombinant Antibodies. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 1348, pp. 7–11. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2999-3_2
- Malavasi, F. et al. 1994. Human CD38: a glycoprotein in search of a function. *Immunology Today*, 15(3), pp. 95–97. Available at: [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(94\)90148-1](https://doi.org/10.1016/0167-5699(94)90148-1)
- Malavasi, F. et al. 2008. Evolution and Function of the ADP Ribosyl Cyclase/CD38 Gene Family in Physiology and Pathology. *Physiological Reviews*, 88(3), pp. 841–886. Available at: <https://doi.org/10.1152/physrev.00035.2007>
- Martin, T.G. et al. 2019. Therapeutic Opportunities with Pharmacological Inhibition of CD38 with Isatuximab. *Cells*, 8(12), p. 1522. Available at: <https://doi.org/10.3390/cells8121522>
- Menzel, S. et al. 2018. Nanobody-Based Biologics for Modulating Purinergic Signaling in Inflammation and Immunity. *Frontiers in Pharmacology*, 9, p. 266. Available at: <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00266>
- Morandi, F. et al. 2018. CD38: A Target for Immunotherapeutic Approaches in Multiple Myeloma. *Frontiers in Immunology*, 9. Available at: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.02722> (Accessed: 27 January 2022)
- Moreau, P. et al. 2021. Maintenance with daratumumab or observation following treatment with bortezomib, thalidomide, and dexamethasone with or without daratumumab and autologous stem-cell transplant in patients with newly diagnosed multiple myeloma (CASSIOPEIA): an open-label, randomised, phase 3 trial. *The Lancet. Oncology*, 22(10), pp. 1378–1390. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(21\)00428-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(21)00428-9)
- Morgan, G.J., Walker, B.A. and Davies, F.E. 2012. The genetic architecture of multiple myeloma. *Nature Reviews Cancer*, 12(5), pp. 335–348. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrc3257>
- Müller-Esterl. 2011. *Biochemie - Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*. 2. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.

- Mustafa, N. et al. 2021. Determinants of response to daratumumab in Epstein-Barr virus-positive natural killer and T-cell lymphoma. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 9(7), p. e002123. Available at: <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-002123>
- Piedra-Quintero, Z.L. et al. 2020. CD38: An Immunomodulatory Molecule in Inflammation and Autoimmunity. *Frontiers in Immunology*, 11, p. 3111. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.597959>
- Raje, N. et al. 2019. Anti-BCMA CAR T-Cell Therapy bb2121 in Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine*, 380(18), pp. 1726–1737. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1817226>
- Rajkumar, S.V. 2019. Multiple Myeloma: Every Year a New Standard?. *Hematological oncology*, 37(Suppl 1), pp. 62–65. Available at: <https://doi.org/10.1002/hon.2586>
- Rennert, P.D. et al. 2021. Anti-CD19 CAR T Cells That Secrete a Biparatopic Anti-CLEC12A Bridging Protein Have Potent Activity Against Highly Aggressive Acute Myeloid Leukemia In Vitro and In Vivo. *Molecular Cancer Therapeutics*, 20(10), pp. 2071–2081. Available at: <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-20-1030>
- San-Miguel, J. et al. 2023. Cilta-cel or Standard Care in Lenalidomide-Refractory Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine*, 389(4), pp. 335–347. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2303379>
- Schlothauer, T. et al. 2016. Novel human IgG1 and IgG4 Fc-engineered antibodies with completely abolished immune effector functions. *Protein engineering, design & selection: PEDS*, 29(10), pp. 457–466. Available at: <https://doi.org/10.1093/protein/gzw040>
- Schuster. 2021. Therapeutisches Potential von CD38-spezifischen Schwere-Ketten-Antikörpern und Nanobody-Dimeren beim Multiplen Myelom. Monographie, Fachbereich Humanmedizin, Universität Hamburg, Hamburg, <https://ediss.su.b.uni-hamburg.de/handle/ediss/9347>
- Schütze. 2021. Humanisierte Schwerekettenantikörper für die Markierung und Tötung CD38-exprimierender Tumorzellen. Monographie, Fachbereich Human-

- medizin, Universität Hamburg, Hamburg, <https://ediss.sub.uni-hamburg.de/handle/ediss/8935>
- Schütze, K. et al. 2018. CD38-Specific Biparatopic Heavy Chain Antibodies Display Potent Complement-Dependent Cytotoxicity Against Multiple Myeloma Cells. *Frontiers in Immunology*, 9, p. 2553. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02553>
- Sonnen, A.F.-P. and Henneke, P. 2014. Structural Biology of the Membrane Attack Complex', in G. Anderluh and R. Gilbert (eds) *MACPF/CDC Proteins - Agents of Defence, Attack and Invasion*. Dordrecht: Springer Netherlands (Subcellular Biochemistry), pp. 83–116. Available at: https://doi.org/10.1007/978-94-017-8881-6_6
- Wang, G. et al. 2016. Molecular Basis of Assembly and Activation of Complement Component C1 in Complex with Immunoglobulin G1 and Antigen. *Molecular Cell*, 63(1), pp. 135–145. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.05.016>
- Wang, X., Mathieu, M. and Brezski, R.J. 2018. IgG Fc engineering to modulate antibody effector functions. *Protein & Cell*, 9(1), pp. 63–73. Available at: <https://doi.org/10.1007/s13238-017-0473-8>
- Weers, M. de et al. 2011. Daratumumab, a Novel Therapeutic Human CD38 Monoclonal Antibody, Induces Killing of Multiple Myeloma and Other Hematological Tumors. *The Journal of Immunology*, 186(3), pp. 1840–1848. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003032>.
- Xu, J. et al. 2021. Nanobodies from camelid mice and llamas neutralize SARS-CoV-2 variants. *Nature*, 595(7866), pp. 278–282. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03676-z>
- Zanwar, S., Nandakumar, B. and Kumar, S. 2020. Immune-based therapies in the management of multiple myeloma. *Blood Cancer Journal*, 10(8), p. 84. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41408-020-00350-x>
- Zocchi, E. et al. 1993. A Single Protein Immunologically Identified as CD38 Displays NAD⁺ Glycohydrolase, ADP-Ribosyl Cyclase and Cyclic ADP-Ribose Hydrolase

Activities at the Outer Surface of Human Erythrocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 196(3), pp. 1459–1465. Available at: <https://doi.org/10.1006/bbrc.1993.2416>

Danksagung

Mein besonderer Dank geht an meinen Doktorvater Prof. Dr. Peter Bannas, der mich immer mit kritischem und konstruktivem Feedback unterstützt hat und an meinen Betreuer Prof. Dr. Friedrich Koch-Nolte für die inspirierenden stundenlangen Besprechungen und die tiefgründigen fachlichen Korrekturen. Danke, dass ich so viel von euch lernen konnte.

Dankeschön an die Else-Kröner-Fresenius-Stiftung, die mich im Rahmen des iPRIME Promotionskollegium durch ein Stipendium finanziell unterstützt hat.

Mein herzlicher Dank geht an die gesamte Arbeitsgruppe Bannas/Nolte für die tollen Vorarbeiten, die große Unterstützung und die schöne Zeit im Labor. Und mein besonderer Dank geht an Julia Hambach, die mich immer hilfsbereit und kreativ unterstützt hat. Mein großer Dank geht an Birte Albrecht, die mich in meiner Anfangszeit in die Tiefen der Labormethoden eingeführt hat und an Marten Junge, der mir oft mit dem FACS-Gerät geholfen hat und immer Zeit für einen Kaffee oder ein Gespräch hatte. Und mein Dank geht an Wladimir Schäfer und Tobias Schäfer, die mir komplizierte naturwissenschaftliche Fragen stets mit Muße beantwortet und erklärt haben.

Ein großes Dankeschön an meine Familie und Freunde, die immer an mich glauben und an meine Hockeymannschaft, die mich auf und neben dem Platz unterstützt.

Und Dankeschön an Maximilian für die Ruhe und Kraft.

Lebenslauf

Lebenslauf entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

Lebenslauf

Lebenslauf entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

Eidesstattliche Versicherung

[als letztes Blatt in die Dissertation einzubinden]

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: